

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hautkrankheiten
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Happle
Klinik für Dermatologie mit Schwerpunkt Andrologie
Direktor: Prof. Dr. Walter Krause

Der Einfluss einer Leukozytospemie
auf die Morphologie humaner
Spermatozoen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Thorsten Steinfeldt

aus Eutin

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 12.12.2002, gedruckt
mit Genehmigung des Fachbereich.

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. Krause

Korreferent: PD Dr. Heidenreich

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	3
1.1 Männliche Fertilität	3
1.1.1 Ablauf der Spermiogenese	3
1.1.2 Ejakulatbefund und Fertilität	6
1.1.3 Der morphologische Ejakulatbefund und die Fertilität	7
1.1.4 Variabilität der Morphologie von Spermatozoen	9
1.2 Infertilität und Leukozytospermie	10
1.2.1 Definition und Prävalenz von Leukozytospermie	10
1.2.2 Das physiologische Auftreten von Leukozyten im Ejakulat	10
1.2.3 Ursachen einer Leukozytospermie	13
1.2.4 Bisherige Veröffentlichungen	15
1.3 Untersuchungen der Spermatozoen mit dem CASA-System	18
1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Untersuchungsaufbau	21
2.2 Gewinnung und Herstellung der Ausstrichpräparate	22
2.3 Die Leukozytendetektion	23
2.4 Methode der Morphologie-Klassifikation und Ausmessung	24
2.4.1 WHO-Klassifikation der Spermatozoen	24
2.4.1.1 Klasseneinteilung der Kopfdefekte	25
2.4.1.2 Schwanzdefekte	26
2.4.2 Das CASA-System	26
2.4.2.1 Konfiguration des Klassifikators	28
2.4.2.2 Auswahl der erhobenen Daten	29
2.5 Statistik	30
3 ERGEBNISSE	31
3.1 Gesamtstichprobe	31
3.2 Anteile der Spermatozoenkopfformen	34
3.3 Flächenausdehnung der Spermatozoenkopfformen	36
3.4 Längenausdehnung der Spermatozoenkopfformen	37
3.5 Breitenausdehnung der Spermatozoenkopfformen	38
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	39

4 DISKUSSION	41
4.1 Die angewendete Methodik	41
4.1.1 Der Untersuchungsaufbau	41
4.1.2 Das CASA-System	43
4.2 Der Einfluss einer Leukozytospemie auf die Spermatozoenmorphologie	45
4.3 Schlussfolgerungen	49
5 ZUSAMMENFASSUNG	50
6 LITERATURVERZEICHNIS	52
7 ANHANG	66
7.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer	66
7.2 Lebenslauf	67
7.3 Danksagung	68

1 Einleitung

1.1 Männliche Fertilität

1.1.1 Ablauf der Spermiogenese

Die folgende Zusammenfassung soll einen Überblick über die Spermatogenese und deren endokrine Modulation geben und stützt sich auf Darstellungen von Aumüller (1991) und Wuttke (1990). Der Bildungsort der reifen männlichen Keimzellen sind die Tubuli seminiferi, die sogenannten Hodenkanälchen. Aus den der Basalmembran der Tubuli vollständig anliegenden „Reserve-Stammzellen“ (Spermatogonien Typ A dark) gehen durch mitotische Teilung „Erneuerungs-Stammzellen“ (Spermatogonien Typ A pale) hervor, welche durch mitotische Teilung während der regulären Spermatogenese zu B-Spermatogonien werden. Letztere haben nur noch schmalen Kontakt mit der Basalmembran und treten nach ihrer Entstehung in die Meiose ein, womit sie zu primären Spermatozyten werden. Nach Abschluss dieser ersten meiotischen Zellteilung liegen Spermatozyten zweiter Ordnung vor. Dieser Vorgang wiederholt sich –ausgehend von den Spermatogonien– alle 16 Tage. Die sekundären Spermatozyten treten sofort nach ihrer Entstehung in die zweite Reifeteilung ein. Nach Abschluss dieser Meiose liegen dann die haploiden Prä spermatiden vor. Die einzelnen Abkömmlinge (der Klon) sind noch über Interzellularbrücken miteinander verbunden, somit rücken breite Klone während der Samenzellbildung lumenwärts. Die Zellen eines Klons können sogenannte Symplasmen bilden und im Ejakulat als doppel- oder mehrkernige Spermien erscheinen. Noch während der zweiten Reifeteilung wird ein enger Kontakt zwischen den Prä spermatiden und den Sertoli-Zellen hergestellt und sind in bezug auf die Ernährung von diesen abhängig. Während dieser Zeit differenzieren sich die Prä spermatiden zu Spermatiden durch Entwicklung von Akrosom und Flagellum, wobei sie sich unter Elongation und Kondensation des Kernchromatins zu Spermatozoen weiterentwickeln. Charakteristisch ist eine zunehmende Zellstreckung, wobei zunächst ein mit

Hyalinuronidase gefüllter Vesikel des Golgi-Apparates mit dem Zellkern in engen Kontakt tritt. Die Hyaluronidase baut später die Eizellhülle beim Durchtritt des Spermiums an. Der Zellkern, der zum Kopf des reifen Spermiums wird, erhält eine ovale Form, das Zytoplasma wird nach hinten verdrängt, während das Akrosom sich abplattet und die Vorderseite des Kerns wie eine Kappe überzieht. Nach Beendigung des geschilderten Ablaufs werden die Spermatozoen ins Rete Testis geschwemmt. Der beschriebene Spermatogenesezyklus dauert etwa 74 Tage. Da in ein und demselben Bereich des Tubulusepithels drei verschiedene Stadien der Spermatogenese stattfinden können, die alle verschiedene Hormonspiegel bedürfen, stellt sich im spermiogenetischen Epithel ein empfindliches Gleichgewicht an trophischen und differenzierungsfördernden bzw. endokrinen Substanzen ein. Die kleinste Störung führt zur Bildung pathomorpher Samenzellen. Über die Ductuli efferentes testes gelangen die Spermatozoen dann in den Nebenhoden, wo sie heranreifen. Man nimmt an, dass es durch eine Veränderung der Spermienmembran zu einer Erhöhung der Motilität kommt. Im Nebenhoden finden Resorptions- und Sekretionsprozesse statt. Resorbiert werden auch korpuskuläre Bestandteile, z.B. verbliebene Restkörper und Spermatozoen. Auch die Tätigkeit des Nebenhodenepithels steht stark unter dem Einfluss von Geschlechtshormonen. Die Reifungs- und Transportvorgänge durch den Epididymis nehmen 8 bis 16 Tage in Anspruch, womit vom Beginn der Spermatogenese bis zum Erscheinen der Spermatozoen im Ejakulat 82 bis 90 Tage vergehen können. Ein grosser Teil der Spermatozoen wird in den Vasa deferentia und in der Ampulla ductus deferentis gespeichert und können hier über Monate ihre Befruchtungsfähigkeit behalten.

Zentrale Regulatorhormone der Spermatogenese stellen LH und FSH dar. Die Sekretion dieser Gonadotropine wird durch das hypothalamische Releasinghormon GnRH moduliert. Die Gonadotropinausschüttung kann durch kompetitive Hemmung der GnRH-Rezeptoren als auch direkt durch Testosteron, DHT und Östrogen gehemmt werden. Weiterhin hat das durch die Sertolizellen gebildete Inhibin eine potentiell inhibierende Wirkung, das Activin

einen stimulierenden Effekt auf die Gonadotropinsekretion. Ausserdem wirken diese Hormone intratestikulär stadienspezifisch auf die Interaktionen der Sertoli- mit den Keimzellen ein. LH wirkt über das unter seinem Einfluss in den Leydigzellen gebildete Testosteron indirekt auf die Spermatogenese ein, während FSH über die Sertolizellen direkten Einfluss auf die Gametogenese besitzt. In den Testes werden nur auf den somatischen Zellen Androgenrezeptoren exprimiert, welche dann die Androgenwirkung an die Keimzellen weitervermitteln, wobei eine direkte Wirkung auf die Keimzellen durch androgenbindendes Protein diskutiert wird. Für die Initiierung und Erhaltung einer nur qualitativ intakten Spermatogenese beim Menschen kann die alleinige Anwesenheit von FSH oder LH ausreichend sein. Es ergeben sich Hinweise darauf, dass diese beiden Hormone den jeweils anderen Rezeptor positiv beeinflussen können. Gleichzeitig führen FSH und Testosteron zu einer verstärkten Proliferation der A-pale Spermatogonien (Erneuerungs-Stammzellen). Neben der endokrinen Regulation beeinflussen zusätzlich lokale Regulationsmechanismen die Gametogenese. Neben parakriner Kommunikation und Interaktion zwischen einzelnen Zellen und Kompartimenten des Hodens liegen auch autokrine und intrakrine Mechanismen vor, weshalb von der Existenz lokaler Faktoren gesprochen wird. Testosteron wirkt als in den Leydigzellen produzierter endokriner Faktor und lokaler Regulator direkt auf die Samenkanälchen. Es steuert lokal die Spermatogenese und hat einen unmittelbaren Einfluss auf die peritubulären Zellen, weshalb auch die Exprimierung von Androgenrezeptoren durch Testosteron moduliert wird. Der letztgenannte Effekt wird zusätzlich über die Sertolizellen durch FSH signifikant verstärkt. Von Keimzellen gebildete lokale Faktoren wie β -Endorphine greifen inhibierend in die Interaktionen der Leydig- mit den Sertolizellen ein, während α -MSH und ACTH an dieser Stelle stimulierend einsetzen. Auch die Regulation der testikulären Temperatur obliegt hormonellen Einflüssen. Stimulierend auf die testikuläre Gefässaktivität wirken Adenosin und Kallikrein, inhibitorisch wirken Prostaglandine, Histamin und Serotonin. LH und hCG beeinflussen über

Rezeptoren an Endothelzellen inhibierend als auch stimulierend die Vasoaktivität.

Entscheidend ist, dass diese endokrinen Modulationen im Rahmen der Spermatogenese übergeordneten Einflussmöglichkeiten des Hypothalamus und der Grosshirnrinde unterliegen. Auch die Relevanz des vegetativen Nervensystems und dessen komplexe Wechselwirkungen mit den beschriebenen Regelkreisen sowie die direkte Wirkung seiner endokrinen Korrelate auf das beschriebene Organsystem darf im Zusammenhang mit dieser Untersuchung nicht unterschätzt werden. Aufgrund der Komplexizität dieser Zusammenhänge und noch vieler offener Fragen auf Ebene der Spermatogenese sowie deren endokriner und neuronaler Modulation, lassen sich nur in wenigen Fällen spezifische Ejakulatbefunde einer entsprechenden Störungen zuordnen.

1.1.2 Ejakulatbefund und Fertilität

Der Ejakulatbefund als wichtigste Laboruntersuchung im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik kann in Anlehnung an WHO-Vorgaben charakterisiert werden (WHO, 1999). Das Fehlen reifer Spermien wird als Azoospermie, Werte kleiner als 10^6 Spermatozoen/ml Ejakulat als Kryptozoospermie, Werte kleiner als 20 mal 10^6 /ml als Oligozoospermie und Werte über 250 mal 10^6 /ml als Polyzoospermie beschrieben. Bei einem Anteil von weniger als 50% progressiv motilen Spermien im Ejakulat wird von Asthenozoospermie, bei mehr als 70% deformierter Spermien wird von Teratozoospermie gesprochen. Wenn keiner dieser Befunde vorliegt, wird dieses als Normozoospermie bezeichnet. Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Ejakulatparametern und tatsächlicher Fruchtbarkeit liegen einige Untersuchungen mit verschiedenen Studiendesigns vor (z.B. Matorras et al., 1995; Mayaux et al., 1985; Hinting et al., 1988), die jedoch durchweg zeigen, dass der Zusammenhang zwischen

Ejakulatqualität und Befruchtungswahrscheinlichkeit nicht sehr eng ist. Welcher Basisparameter von grösserer oder geringerer Bedeutung ist, konnte bisher nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Bezüglich des Einflusses der Morphologie auf die Fertilisierungsrate konnten Untersuchungen von Kruger et al. (1986), Grow et al. (1994) und Holland-Moritz et al. (1992) einen signifikanten Anstieg der Fertilisierungsrate bei ansteigendem Anteil „normalgeformter“ Spermatozoen im Ejakulat zeigen. Jedoch ist es auch anhand dieser Studien nicht möglich kritische Werte festzulegen, anhand derer man eine Befruchtung sicher ausschliessen kann.

1.1.3 Der morphologische Ejakulatbefund und die Fertilität

Die Spermatozoenmorphologie hat für die Fertilisierungskapazität eine grundlegende Bedeutung, da pathomorphe Spermatozoen Zervikalschleim schlechter durchdringen können (Katz et al. 1990). Zudem hat sich die Spermatozoenmorphologie als Prognoseparameter bezüglich der Spermatozoenfunktion (Mortimer et al. 1990) und der Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen bei der assistierten Reproduktion (Kruger et al. 1988,1993; Grow et al. 1994) erwiesen. Durch Untersuchungen an Spermatozoen, die aus dem weiblichen Genitaltrakt entnommen worden waren, konnten Kriterien erstellt werden, die ein morphologisch als normal zu bezeichnendes, zur Befruchtung fähiges Spermatozoon, hinreichend beschreiben konnten. Diese „Normalwerte“ werden in einem folgenden Kapitel erläutert und stellen die Kriterien nach WHO (WHO 1999) dar (vgl. 2.4.1). Die WHO fordert, dass ein normales Ejakulat mindestens 30% normalgeformte Spermatozoen enthält. Bisher konnte noch nicht festgestellt werden, bei welchem Prozentsatz sicher keine Befruchtung mehr möglich ist. Bei einem Anteil von über 70% abnorm geformter Spermatozoen wird von einer Teratozoospermie, bei einer derart hohen Rate geht oft auch eine Oligo- und oder eine Asthenozoospermie (Singer et al. 1980) einher. In einem solchen Falle wird von einem OAT-Syndrom (= Oligo-Astheno-Teratozoospermie-Syndrom) gesprochen. Bezüglich der Relevanz

und der Auswirkungen der verschiedenen morphologischen Abweichungen sind sich viele Autoren nur hinsichtlich der Tatsache einig, dass pathomorphe Spermatozoen die Zervix nur zu einem geringen Teil passieren und somit für eine Fertilisierung ausfallen (Eggert-Kruse et al. 1995), ansonsten werden einige voneinander abweichende Arten von Kriterien zur Beurteilung der Morphologie und der Genese von abnormen Formen diskutiert. Die Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen geben die sogenannten „strictly normal sperm criteria“ an (Kruger et al. 1988 und 1993; Enginsu et al. 1993; Kaskar et al. 1994), nach denen allein der Prozentsatz an normalen Spermatozoen über die Wahrscheinlichkeit des Eintritts einer Schwangerschaft bestimmt. Die untere Grenze normaler Fertilität soll bei 14% normaler Spermatozoen im Ejakulat liegen. Bei einem Anteil normaler Spermatozoen zwischen 4% und 14% ist sie eingeschränkt fertil, und bei Vorliegen von weniger als 4% streng normaler Spermatozoen wird von einer Infertilität gesprochen. Andere Autoren versuchen ausgehend von der Pathomorphologie der Spermatozoen Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der männlichen Reproduktionsorgane zu ziehen. Die Düsseldorfer Klassifikation entspricht den Thesen von einigen Autoren, die durch Vergleich von Spermatozoenmorphologien und Hodenbiopsiebefunden erarbeitet wurde (Hofmann 1979; Hofmann und Haider 1985). Da diese Untersuchungen bislang noch von keiner anderen Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, sind die Thesen weniger anerkannt. Nach der Düsseldorfer Klassifikation werden drei Hauptgruppen morphologischer Störungen unterschieden. Hierbei handelt es sich um Überstreckungsstörungen, Akrosomdefekte und Flagellumstörungen. Diesen morphologischen Defekten werden nach der genannten Klassifikation pathophysiologische Korrelate zugeordnet. Zusätzlich werden nach dieser Art der Beurteilung ausgehend vom Ausprägungsgrad der morphologischen Störung auch verschiedene Schweregrade der Pathomorphologie unterschieden. Die Frankfurter Nomenklatur basiert auf der Düsseldorfer Klassifikation und unterscheidet sich lediglich darin, dass sie einzelne Klassen aus praktikablen Gründen zu grösseren Gruppen zusammengefasst hat.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass man bisher nicht in der Lage war, Grenzwerte oder Kriterien festzulegen, anhand derer man eine Befruchtung ausschliessen kann. Bei zur Hilfenahme der morphologischen Untersuchung kann jedoch zumindest angenommen werden, dass im „unteren Qualitätsbereich“ eine Fertilitätseinschränkung vorliegt. Um allerdings prognostische Aussagen machen zu können, muss die Variabilität der Ejakulatqualität in bezug auf die Morphologie von Spermatozoen berücksichtigt werden.

1.1.4 Variabilität der Morphologie von Spermatozoen

Um Aussagen hinsichtlich der Qualität eines Ejakulats zu machen, muss sicher sein, wie gross die intraindividuellen Variationsbreiten bezüglich der Basisparameter Konzentration, Motilität und Morphologie sind. Auch die Abhängigkeit dieser Parameter von der Abstinenz und anderen Einflüssen muss bei einer Längsschnittstudie bekannt sein. Da in der vorliegenden Erhebung lediglich die Spermatozoenmorphologie herangezogen wird, sollen sich entsprechende Erläuterungen auf diesen Parameter beschränken.

Es liegen einige Untersuchungen vor, die in prospektiven Längsschnittstudien die Varianz der Spermatozoenmorphologie darstellen konnten. So konnte eine Erhebung von Poland et al. (1986) bei 15 gesunden Männern über einen Zeitraum von einem halben Jahr und allzweiwöchiger Ejakulatgewinnung keine Abhängigkeit der Morphologie von der Abstinenz zeigen. Zudem ergab diese Untersuchung, dass jeder Proband eine ganz spezifische Spermienmorphologie bei geringer Varianz der einzelnen Klassifikationsgruppen aufweist. Diese Ergebnisse bezüglich der Morphologie lagen gegenteilig hinsichtlich der Spermatozoenkonzentration vor. Auch Untersuchungen von Hotchkiss (1941) und MacLeod (1964) beschreiben ein individuell charakteristisches Spermogramm, nachdem sogar die Probanden identifiziert werden könnten. Weitere Einflussgrössen auf die Morphologie stellen zum Beispiel das Alter (Schwartz, 1983) sowie auch toxische Substanzen (Gerhard, 1992) dar.

1.2 Infertilität und Leukozytospemie

1.2.1 Definition und Prävalenz von Leukozytospemie

Der Begriff der Leukozytospemie beschreibt die Überschreitung einer festgelegten Anzahl von Leukozyten im Ejakulat. Nach Kriterien der WHO (1993) wird von einer Leukozytospemie bei Anwesenheit von mehr als 10^6 Leukozyten/ml Ejakulat gesprochen. Ihre Prävalenz hängt von der untersuchten Population als auch von den verwendeten Untersuchungsmethoden ab (Wolff, 1995). So differieren die Ergebnisse durchgeführter Studien sehr stark. Bei Verwendung immunzytologischer Methoden zur Ermittlung der Leukozytenkonzentration wurden im Mittel höhere Konzentrationen festgestellt als bei Verwendung der Peroxidase-Methode (Politch et al., 1993). Die WHO gibt eine Häufigkeit der Leukozytospemie bei infertilen Patienten von 10% bis 20% an.

1.2.2 Das physiologische Auftreten von Leukozyten im Ejakulat

Die Präsenz von Leukozyten im Ejakulat ist nicht pathologisch per se, da das Vorhandensein von Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen physiologisch auftritt. Die Hoden enthalten eine hohe Zahl an interstitiellen Makrophagen (Hermo et al., 1978; Pöllänen et al., 1987; El-Demiry et al., 1987) und Mastzellen (Hermo et al., 1978; Hofmann et al., 1983; Maseki et al., 1981; Nagai et al., 1992). Im normalen testikulären Gewebe befinden sich wegen der Blut-Hoden-Schranke keine Leukozyten in den Tubuli seminiferi (Dym et al., 1970; Johnson et al., 1970; Tung et al., 1971). Im Rete testis und den Ductuli efferentes ist die Blut-Hoden-Schranke abgeschwächt, was den Immunzellen einen Kontakt mit den Spermatozoen und ein Übertreten in das exkretorische Kompartiment ermöglicht. Tierversuche haben gezeigt, dass das Rete testis die

wichtigste Kontaktstelle zwischen aktivierten Immunzellen und Spermatozoen ist (Tung et al., 1987). Im Epididymis liegt eine dichte Population von Lymphozyten und Makrophagen vor (Dym et al., 1975; Wang et al., 1983; Yeung et al., 1994). Ähnlich wie das Rete testis scheint im Epididymis eine aktive Immunregulation zur Vermeidung autoimmuner Affektionen von Spermatozoen stattzufinden (Ritchie et al., 1984). Deformierte und seneszente Spermien werden dort von Makrophagen phagozytiert (Tomlinson et al., 1992). In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Grossteil der Spermatozoenphagozytose im Epididymis stattfindet (Phadke et al., 1961; Phadke, 1975; Holstein, 1978). Bei vasktomierten Patienten konnten signifikant weniger Leukozyten nachgewiesen werden als in nicht-vasktomierten (Olsen et al., 1984; Anderson et al. 1990). In den Vasa deferentes lassen sich in hoher Konzentration T-Lymphozyten und Makrophagen feststellen, deren Hauptfunktion Prävention ascendierender Infektionen sein soll (El-Dimiry et al., 1985). In den Samenbläschen ist die Konzentration an Immunzellen vermindert (El-Dimiry et al., 1985). Die dortige Sekretion immunsuppressiver Substanzen soll dabei eine Rolle spielen (Aumüller et al., 1992). Vergleichbar mit dem Epididymis und den Vasa deferentes enthält auch die Prostata eine hohe Konzentration an T-Lymphozyten (El-Dimiry et al., 1985). Zusätzlich konnten im Interstitium auch B-Lymphozyten beschrieben werden, die der Ursprung der sekretorischen Immunglobuline im Ejakulat sein könnten. Vor dem Hintergrund, dass Granulozyten den wichtigsten Leukozytenanteil im Ejakulat vasktomierter Patienten darstellen, und nur im geringen Ausmass im Hoden und Epididymis vorkommen, ist es naheliegend, dass der grösste Anteil der Granulozyten der Prostata und dem Epididymis entstammt (Anderson et al. 1990).

Für das Verständnis eines potentiellen Pathomechanismus der Beeinträchtigung der Fertilität unter Leukozytospermie ist die Verteilung der Leukozytensubpopulationen nicht unerheblich. Als dominierender Subtyp der Leukozyten wurde in einigen Studien der Granulozyt als dominierender Zelltyp beobachtet (Eggert-Kruse et al., 1992; Wolff et al., 1988; Aitken et al., 1994;

Tomlinson et al.,1993). Im allgemeinen repräsentieren Granulozyten 50% bis 60%, Makrophagen 20% bis 30% und T-Lymphozyten lediglich 2% bis 5% aller Leukozyten im Ejakulat. Plasmazellen und B-Lymphozyten werden seltener angetroffen (Wolff et al., 1988).

1.2.3 Ursachen einer Leukozytospemie

Bei jedem Auftreten von Leukozyten im Ejakulat muss eine bakterielle Erkrankung als Ursache in Betracht gezogen werden. Die Bedeutung von Mikroorganismen bei Leukozytospemie wurde durch Untersuchungen von Berger et al. (1983), Giamarellou et al. (1984) und Micic et al. (1989) gestützt, die eine Reduktion der Leukozytenkonzentration unter antibiotischer Therapie beobachteten. Fraglich ist, ob eine Leukozytospemie grundsätzlich auch das Vorhandensein einer Infektion bedeutet. Auch ist die Trennung von Infektion und harmloser bakterieller Besiedlung sehr wichtig. Im Rahmen einer Infektion muss eine Beschädigung oder Dysfunktion eines Organs durch Mikroorganismen hervorgerufen sein (Merlin et al., 1994). Die zwei häufigsten Erreger bei Infektionen im Genitaltrakt mit potentieller Pathogenität sind *Ureaplasma urealyticum* und *Chlamydia trachomatis*. Beide können eine Urethritis (Bowie et al., 1984) und Prostatitis (Brunner et al., 1983; Hofstetter et al., 1970; Bruce et al., 1983) induzieren. *Chlamydia trachomatis* ist am häufigsten Ursache der akuten Epididymitis bei jungen Männern (Berger et al., 1978; Bruce et al., 1981) und der Tuben-Infertilität bei Frauen (Paavonen et al., 1989; Sellors et al., 1988). Wie häufig Mikroorganismen die Ursache einer Leukozytospemie bei infertilen Patienten sind ist unsicher. Die meisten Autoren sehen keine signifikante Beziehung zwischen dem Auftreten von Leukozyten und Mikroorganismen im Ejakulat (El Demiry et al., 1986; Harrison et al., 1991; Berger et al., 1982; Hillier et al., 1990; Barrat et al., 1990, Close et al., 1990; Cumming et al., 1990). Wolff et al. (1995) stellten bei 54 von 100 Männern mit Leukozytospemie eine negative Mikrobiologie und Serologie im Ejakulat fest. Bei 23 Patienten lagen *Chlamydia trachomatis*-Antikörper vor. Eine weitere Untersuchung (Wolff et al., 1994) zeigte, dass bei über 90% dieser *Chlamydia trachomatis*-Antikörper-positiven Männer keine Chlamydien mehr nachweisbar waren. Auch in dieser Untersuchung waren 80% der untersuchten Ejakulate von Patienten mit Leukozytospemie mikrobiologisch negativ. Bei Vorliegen hoher Keimkonzentrationen werden vor allem *Escherichia coli*, *Ureaplasma*

urealyticum und Chlamydia trachomatis als Verursacher einer Infektion im Genitaltrakt vorgefunden (Brunner et al., 1983; Hofstetter et al., 1970; Meares et al., 1980). Andere Gründe für eine Leukozytospemie können der Konsum von Zigaretten, Alkohol oder Marihuana sein (Close et al., 1990). Eine Erklärung hierfür gibt es bisher nicht. Tomlinson et al. (1992) stellten einen Zusammenhang zwischen hohen Leukozytenkonzentrationen im Ejakulat und normalen Spermatozoenkonzentrationen und deren Morphologie fest. Da Ejakulate oligospermer Patienten eine geringere Konzentration an Leukozyten aufwiesen, folgerten Tomlinson et al. (1992), dass hohe Spermatozoenkonzentrationen hohe Leukozytenwerte mit sich bringen. Auch bei chronischen Viruserkrankungen kann eine Leukozytospemie auftreten. So bei HIV Typ I- (Anderson et al., 1992), Cytomegalie- (Lang et al., 1972) und Hepatitis B-Infektion (Greenblatt et al., 1986). Einige Männer zeigen eine Leukozytospemie über einen langen Zeitraum auf. Bei den meisten von ihnen liegt kein mikrobiologischer Befund vor, selbst diejenigen mit positivem mikrobiologischen Befund behalten nach Eradikation eines Erregers die Leukozytospemie. Andere weisen ein Abfallen der Leukozytenkonzentration im Ejakulat ohne vorgenommene Therapie auf (Comhaire et al., 1986; Purvis et al., 1993). Auch wäre ein Zusammenhang zwischen sexueller Abstinenz und dem Auftreten von Leukozyten im Ejakulat denkbar (Wolff, 1995). So erklärt Wolff (1995) die Möglichkeit einer Erhöhung der Leukozytenkonzentration durch das vermehrte Auftreten alternder Spermatozoen im Epididymis (vgl. 1.2.3.).

1.2.4 Bisherige Veröffentlichungen

Es liegen viele Untersuchungen vor, die eine negative Beeinträchtigung der Spermatozoenfunktion beschreiben. Auf der anderen Seite konnten verschiedene Studien keine negativen Effekte bestätigen. Die meisten epidemiologischen Erhebungen vergleichen die seminalen Leukozytenkonzentrationen von infertilen Patienten mit denen einer fertilen Kontrollgruppe. Auroux et al. (1985) stellten einen signifikant höheren Anteil von Granulozyten der Rundzellfraktion bei 102 subfertilen im Gegensatz zu 106 fertilen Männern fest. Wolff und Anderson (1988) massen eine höhere Leukozytenkonzentration bei 51 infertilen Patienten (Medianwert: $1,035 \times 10^6$ Leukozyten / ml) als bei den 17 fertilen Männern der Kontrollgruppe (Medianwert: $0,17 \times 10^6$ Leukozyten / ml). Im Gegensatz dazu erhoben El-Demiry et al. (1986) signifikant höhere Leukozytenkonzentrationen bei 12 fertilen Personen als bei 69 Infertilen. So auch Kung et al. (1993), die die Leukozytenkonzentration von 16 fertilen mit denen von 49 infertilen Patienten verglichen und wie auch El-Demiry et al. (1986) niedrigere Konzentrationen von Leukozyten bei den Infertilen feststellten. Kung et al. (1993) beobachteten zudem eine Verminderung des Anteils der morphologisch normalen Spermatozoen bei erhöhten Leukozytenkonzentrationen im Ejakulat. Wang et al. (1994) verglichen die Leukozytenkonzentrationen von 101 infertilen mit denen von 10 fertilen Spendern. Bei dieser Erhebung konnte nur eine gering höhere Leukozytenkonzentration bei den infertilen Patienten nachgewiesen werden. Die Prävalenz für eine Leukozytospemie war bei der Untersuchungsgruppe (infertile Personen) höher. Von den 101 Spendern der infertilen Gruppe lag bei 8 Patienten eine Leukozytospemie vor, während diese kein Patient der Fertilen aufwies. Die Heterogenität der Ergebnisse wird durch eine Studie von Harrison et al. (1991) bestätigt, die Leukozytenkonzentration bei fertilen Männern untersuchten. Alle sind in den davor liegenden 12 Monaten Väter geworden. Harrison et al. (1991) massen im Median $0,08 \times 10^6$ Leukozyten/ml im Ejakulat. Bei der vorliegenden Vielfältigkeit der Ergebnisse

muss kritisch hinterfragt werden, ob eine Standardisierung der Messmethoden und Bedingungen vorliegt. Verschiedene klinische Studien stellten einen Zusammenhang zwischen Leukozytenkonzentration und Spermatozoendysfunktion dar. Berger et al. (1982) erkannten eine signifikant inverses Verhältnis zwischen Granulozyten-Konzentration und einem erfolgreichen Hamster-Ei-Penetrations-Test. Zusätzlich waren erhöhte Leukozytenkonzentrationen assoziiert mit verminderter Spermienkonzentration. In einer weiteren Studie behandelten Berger et al. (1983) 32 Männer mit einem schlechten Hamster-Ei-Penetrations-Test über 20 Tage mit Doxycyclin. Bei 18 Männern normalisierte sich der Penetrations-Test, bei 7 Partnerinnen stellte sich eine Schwangerschaft ein. Auch in dieser Erhebung korrelierten die Penetrations-Test-Ergebnisse mit der Leukozytenkonzentration im Ejakulat. Zusätzlich beobachtete Berger et al. (1983) eine Kontrollgruppe von 30 Männern mit ebenfalls schlechten Penetrations-Test ohne Doxycyclin-Therapie. Bei diesen Patienten blieb der Penetrations-Test pathologisch, Schwangerschaften bei Ehefrauen stellten sich nicht ein. Maryuyama et al. (1990) kamen zu dem gleichen Ergebnis bei ähnlicher Methodik. Interessanterweise lag bei den untersuchten Patienten eine sehr hohe Prävalenz für Leukozytospemie vor. Bei 134 von 243 Männern (55,1%) wurde eine Leukozytenkonzentration von über 3×10^6 Leukozyten/ml gemessen. Bei dieser Studie wurden jedoch Fehler bei der Methodik eingeräumt. Cohen et al. (1985) und Talbert et al. (1987) erkannten die Leukozytenkonzentration im Ejakulat als praediktiven Faktor für einen fehlgeschlagenen IVF-ET (In-Vitro-Fertilisation-Embryotransfer). Wolff et al. (1990) entdeckten eine signifikante Beziehung zwischen Leukozytospemie und verminderter Spermatozoenqualität. Bei 138 infertilen Männern ohne Leukozytospemie lag eine signifikant höhere Spermienkonzentration bei besseren Motilitätsparametern als bei 41 infertilen Männern mit Leukozytospemie vor. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Eggert-Kruse et al. (1992) und Gonzales et al. (1992), die bei Infertilen mit erhöhten Leukozytenkonzentrationen eine verminderte Spermienkonzentration, Motilität und Morphologie feststellten. Studien von Aitken et al. (1994) und Tomlinson et al. (1993) konnten keine

negativen Effekte von Leukozyten auf die Spermatozoenfunktion und Fertilität darstellen. Die gemessenen medianen Leukozytenkonzentrationen dieser Autoren lag –fertile und infertile Patienten- bei nur 13000 und 14000 Leukozyten/ml Ejakulat. Harrison et al. (1991) massen bei Verwendung der gleichen Methode eine mediane Konzentration von $0,8 \times 10^6$ Leukozyten/ml bei fertilen Männern. De Geyter et al. (1994) konnten keine Beziehung zwischen Leukozytenkonzentration und Erfolg des IVF-ET (in vitro Fertilisation-Embryo-Transfer) erkennen. Die Morphologie der Spermien wurde nicht durch das Auftreten von Leukozyten im Ejakulat beeinträchtigt.

1.3 Untersuchung der Spermatozoen mit dem CASA-System

In dieser Untersuchung wird ein CASA-System zur Ausmessung der Spermatozoenmorphologie eingesetzt. Die Begründung hierfür liegt in der teilweise nur unzureichend aussagefähigen Qualität der erhobenen Routinedaten. Erhebungen von Menkfeld et al. (1990) und Kruger et al. (1987) beschreiben den Mangel an Objektivität von mit dem Lichtmikroskop in der Routine ermittelten Daten. Hierfür kommen einige Ursachen in Betracht. So werden mehrere Personen für die herkömmlichen Messungen eingesetzt, die jedoch alle nach subjektiven Erfahrungswerten mehr oder weniger verschieden klassifizieren (Zaini et al., 1985). Die so erhaltenen Spermioogramme mögen im Einzelfall genügend Aussagekraft haben, können jedoch nicht für vergleichende Studien oder interlaboriell verwendet werden. Die Ergebnisse hängen wesentlich von Erfahrung und Ausbildung des Untersuchers ab. Somit differieren die Auswertungen von Labor zu Labor und selbst in einem Labor können die Ergebnisse der Morphologie stark voneinander abweichen (Zaini et al., 1985). Wenn zum Beispiel in einem Präparat viele kleine aber noch normale Spermatozoen vorliegen, jedoch im folgenden Präparat relative grosse, ebenfalls noch normale Spermatozoen, dann besteht die Gefahr, dass der Untersucher die Spermatozoen des zweiten Ausstrichs als zu gross klassifiziert. Zum anderen ist es ohne Computer schwer möglich, Flächen eines Spermiums zu vermessen. Durch Einsatz des CASA-Systems wird die Möglichkeit geschaffen immer nach gleichen Kriterien zu klassifizieren, zusätzlich wird durch die genaue Ausmessung in μm und μm^2 eine in bisherigen Studien nicht vorhandene Genauigkeit erreicht. Die Umsetzung der Einhaltung genauer Masskriterien in Einheiten bei der Klassifikation ist erst bei Einsatz dieses Computer-Systems möglich. Desweiteren sollen im Rahmen dieser Studie bei Verwendung des CASA-Systems mehr Parameter und somit mehr Daten als bei der lichtmikroskopischen Routine-Untersuchung erhoben werden, evtl. könnten Effekte die vorher in zusammenfassenden Variablen enthalten waren isoliert und dargestellt werden. Zusätzlich können die mit dem CASA-System

erhobenen, standardisierten Daten auch von anderen Labors verwendet werden. Als Nachteil dieses Systems muss die fehlende Flexibilität bei schlechten Präparatfärbungen genannt werden, wodurch oftmals eine Messung unmöglich wird. So färben sich visköse Ejakulate zu stark an und verhindern eine Identifikation durch den Computer. Zum anderen hat das CASA-System Schwierigkeiten zu dicht beieinander liegende Spermatozoen voneinander zu trennen und damit zu klassifizieren (Steigerwald, 1997). Auch die Klassifikation von Spermatozoen-Mittelstücken ist mit Hilfe dieses Systems nicht möglich. Die Methoden der Klassifikationen und Färbemethoden werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Erhebung soll der Einfluss einer Leukozytospemie auf die Morphologie von humanen Spermatozoen überprüft werden. Vor dem Hintergrund, dass die bisher durchgeführten Arbeiten uneinheitliche Ergebnisse aufzeigen und gegensätzliche Schlussfolgerungen mit sich bringen, soll diese Untersuchung durch Anwendung beschriebener Methoden (vgl. 1.3) präzisere und objektivere Daten aufnehmen und die Bandbreite erhobener Daten erweitern. Desweiteren sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Sind Effekte bei den Prozentanteilen der grossen, kleinen, kugeligen, länglichen oder amorphen Spermatozoonkopfformen aufzuzeigen ?
2. Können Beeinträchtigungen bezüglich der Flächen-, Längen- oder Breitenausdehnungen der Klassifikationsparameter dargestellt werden ?
3. Treten Effekte bei der Spermatozoenschwanzmorphologie auf ?
4. Ist das CASA-System den Ansprüchen gerecht geworden ?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsaufbau

Es lagen Daten von 82 Patienten vor, die die Klinik für Andrologie der Universitätsklinik in Marburg wegen eines unerfüllten Kinderwunsches aufsuchten. Die Untersuchungsteilnehmer sind alle anlässlich ihrer entsprechenden Untersuchungen und Diagnostik in der Abteilung für Andrologie erschienen und wurden somit nicht zum Zwecke der Datenerhebung einbestellt. Zu zwei Zeitpunkten wurde die Spermatozoenmorphologie ausgewertet. Zwischen der ersten und der zweiten Untersuchung musste mindestens ein Zeitraum von zwei Monaten liegen jedoch nicht mehr als ein Jahr. Neben einer Überprüfung der Morphologie der Spermatozoen innerhalb eines festgelegten Zeitraumes bei 42 Männern mit vorliegender Leukozytospemie, wurden gleiche Untersuchungen bei 40 Patienten ohne Leukozytospemie als Kontrollgruppe durchgeführt. Eine Azoospermie und Kryptozoospermie stellten Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der vorliegenden Untersuchung dar. Um die Kriterien einer Leukozytospemie zu erfüllen, mussten mehr als 10^6 Leukozyten/ml vorhanden sein. Des weiteren musste bei den Patienten der Untersuchungsgruppe zu beiden Zeitpunkten eine Leukozytospemie vorliegen. Die Datenerhebung erfolgte in Klinik für Andrologie in Marburg zwischen dem 18.9.1999 und dem 01.10.2000. Die Patienten unterzogen sich einer gründlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung zur Identifizierung fertilitätseinschränkender Faktoren. Zum Abschluss ihres Aufenthaltes in der Abteilung wurde das Ejakulat gewonnen. Die morphologische Untersuchung der Spermatozoen fand verblindet statt, das heisst, der Untersucher konnte die Befunde keinem Patienten zuordnen.

2.2 Gewinnung und Herstellung der Ausstrichpräparate

Die Ejakulatgewinnung durch Masturbation erfolgte in einem labornahen Raum. Die Patienten sollten mindestens drei Tage sexuelle Abstinenz einhalten. Nach vollständiger Verflüssigung und Durchmischung der Samenflüssigkeit wurde mit einer Pipette ein Ejakulattropfen auf einen Objektträger aufgebracht, ausgestrichen und anschliessend 24 Stunden luftgetrocknet. Danach wurde die Ejakulatflüssigkeit nach der Papanicolaou-Färbung gefärbt (WHO, 1999). Diese Färbung unterscheidet klar zwischen basophilen und azidophilen Zellkomponenten und erlaubt eine detaillierte Untersuchung des Kernchromatin-Musters. Die Methode wird weltweit in der Diagnostik der Spermatozoenmorphologie als Standardfärbung angewendet (Hargreave & Nilsson, 1983; Glezerman, 1982). Zudem sind nach Papanicolaou gefärbte Präparate sehr dauerhaft; auch nach etlichen Jahren ist nur eine leichte Abblassung der Ausstriche zu bemerken (Krause, 1981). Die von den andrologischen Labors benutzte, modifizierte Färbung nach Hellinga hat sich für die Beurteilung der Spermatozoenmorphologie und die Untersuchung von unreifen Keimzellen als besser geeignet erwiesen und wird deshalb von der WHO (World Health Organisation) für diesen Einsatzbereich als Standardfärbung empfohlen (Hellinga, 1972).

2.3 Die Leukozytendetektion

Für die lichtmikroskopische Auszählung der Leukozyten färbten wir mit Hilfe der Peroxidase-Reaktion (Ludwig et al. 1996) Ejakulatflüssigkeit an. Die dazu notwendige Reaktionslösung bestand aus 125 mg Benzidin, 150 mg Cyanosin und 50 mg Alkohol. Abschliessend wurde die Lösung mit 50 ml Aqua dest. verdünnt. Vor Versetzung des Ejakulats mit der Stammlösung gaben wir 10 µl 3% H₂O₂ Lösung hinzu. Danach verrührten wir einen Tropfen vollständig verflüssigtes, gut durchmisches Ejakulat mit einem Tropfen des Reaktionsgemisches und füllten eine Thoma-Zählkammer mit dieser Flüssigkeit. Nach einer Auszählung im Hellfeldmikroskop bei 1000facher Vergrösserung konnte die Leukozytenkonzentration in 10⁶/ml angegeben werden. Die Leukozyten färbten sich bei Anwendung der geschilderten Methode wie folgt an:

- neutrophile Granulozyten: braun
- Granula der basophilen und der eosinophilen Granulozyten: rot-braun bis violett
- Lymphozyten: leicht rosa

2.4 Methode der Spermatozoenmorphologie-Klassifikation und Ausmessung

Um ein Höchstmass an Objektivität bei der Klassifikation der Spermatozoen zu erreichen, wurde im Rahmen dieser Untersuchung eine computergestützte Vermessung durchgeführt. Als Grundlage zur Klassifikation der Morphologie dienten bei der Auswertung mit Hilfe des CASA-Systems die Kriterien der WHO (WHO, 1999). Grundsätzlich beinhaltet die Beurteilung der Morphologie von Spermatozoen Kopf, Mittelstück und den Schwanz. Für diese Untersuchung wurde jedoch nur die Vermessung und Klassifikation der Köpfe und Spermatozoenschwänze durch das CASA-System herangezogen, da es der Beurteilung der Mittelstücke – im Gegensatz zur Kopfvermessung – an Validität mangelte (Steigerwald & Krause, 1998).

2.4.1 WHO-Klassifikation der Spermatozoen

Als internationaler Standard bei der Beurteilung der Spermatozoenmorphologie haben sich die Kriterien der WHO in ihrer Fassung von 1999 etabliert (WHO, 1999), in der nicht nur die Kriterien der Spermatozoenmorphologie sondern auch die der Spermatozoenmotilität und Spermatozoenanzahl festgelegt sind. Nach WHO-Standard enthält eine normale Samenprobe mindestens 30 % normal geformte Spermatozoen. Als normal geformt wird es beschrieben, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: Es weist einen ovalen Kopf auf. Die Länge beträgt 4,0-5,5 μm , die Breite 2,5-3,5 μm . Das Akrosom sollte gut abgrenzbar sein und 40-70 % der Kopfgrösse ausmachen. Der Quotient aus Länge und Breite liegt zwischen 1,5 und 1,75.

Die WHO empfiehlt mindestens 100, besser 200 Spermatozoen bei mindestens 600facher Vergrösserung zu beurteilen. Bei Untersuchungen von Spermatozoen infertiler Männer lassen sich bis zu 70 verschiedene

Abweichungen von der normalen Spermatozoenmorphologie darstellen (Hotchkiss, 1941; Moench, 1940; Williams, 1937). Die verschiedenen Variationen können alle objektiv beschrieben werden, jedoch ist es einsichtig, dass eine solche grosse Zahl in der Laborroutine nicht verwertbar ist, sondern nur eine Typisierung die Auswertung ermöglicht.

2.4.1.1 Klasseneinteilung der Kopfdefekte

Nach WHO-Kriterien werden die Kopfformen wie folgt differenziert:

- amorph: unregelmässige bis bizarre Kopfkontur
- birnenförmig: Kopfkontur mit dem Aussehen einer Birne (Tropfen)
- doppelköpfig: zwei Köpfe teilen sich ein Mittelstück und eine Geissel; hat Vorrang vor anderen Kopfklassifikationen
- gross-oval: grösser als vorgegebener Normbereich
- zigarrenförmig: geringgradige Überstreckung des Kopfes, Quotient $L/B > 1,75$ (Taperformen)
- rund: kugelige Kopfform, Quotient Länge/Breite $< 1,5$ (Rundkopfspermatozoen)
- grosse Vakuolen ($>20\%$ der Kopffläche)

Nur klar erkennbare Spermatozoen sollen ausgewertet werden. Liegen Grenzfälle vor, so sind diese der am besten passenden Klasse zu zuordnen. Unreife Zellen sind zu vernachlässigen. Bei Vorliegen schwanzloser Köpfe sind diese als „Hals-/Mittelstückdefekt“ zu erfassen. Zytoplasmotropfen am Kopf dürfen maximal ein Drittel der Kopfgrösse haben.

2.4.1.2 Schwanzdefekte

Die Geissel ist mindestens 45µm lang und regelmässig begrenzt. Sie soll schlank, nicht eingerollt oder abgeknickt sein. Pro Kopf soll nur ein Schwanz vorliegen. Schwänze ohne Kopf werden nicht mitgezählt. Die Spermatozoengeisseln sind einzuteilen in normal und abnormal. Ein hoher Prozentsatz von Spermatozoen mit eingerolltem Schwanz kann darauf hindeuten, dass sie hypoosmotischem Stress ausgesetzt waren, wird aber auch bei langsam degenerierenden Zellen beobachtet. Laut WHO-Handbuch ist es nicht erforderlich zwischen den einzelnen Schwanzdefekten zu unterscheiden. Es genügt, den Anteil der normalen Spermatozoenschwänze anzugeben. Die Angabe der Schwanzdefekte nach lichtmikroskopischer Auswertung bezieht sich allerdings nur auf die Spermatozoen mit „normaler“ Kopfform (Haidl & Schill, 1992).

2.4.2 Das CASA-System

Seit einigen Jahren haben Systeme für die computerassistierte Samenanalyse (CASA) Einzug in die andrologische Laborpraxis gefunden. Grundsätzlich beruht die Technik der CASA-Systeme auf der Digitalisierung des mikroskopischen Bildes und der Weiterverarbeitung durch ein Computersystem mit entsprechender Software zur Bildanalyse (Boyers, 1989; Davis, 1992). Die Objektivierung und Vergleichbarkeit von Spermiogrammen war das Ziel der Entwicklung dieser Systeme. Zudem erreichte man die Automatisierung des Untersuchungsablaufs und die Erfassung neuer Parameter. Bei der Spermatozoenmotilität lässt sich somit zum Beispiel die Linearität der Vorwärtsbewegung, die Progressivgeschwindigkeit und die Frequenz der seitlichen Kopfauslenkung darstellen, die mit herkömmlichen mikroskopischen Methoden nicht analysiert werden können.

Für die Bestimmung der Spermatozoenanzahl und Motilitätsparameter stehen den andrologischen Labors schon voll funktionsfähige und routinetaugliche CASA-Systeme zur Verfügung und haben sich auch als von der WHO empfohlene Standardmethode etabliert (WHO, 1999). Durch die Entwicklung neuer Technologien im Soft- und Hardwarebereich stehen seit einigen Jahren auch Systeme zur Analyse der Spermatozoenmorphologie zur Verfügung, die jedoch bisher keinen Einzug in die tägliche Laborroutine genommen haben.

Die Anlage der Firma Mika medical bestand aus einem Lichtmikroskop, Typ BH 2 der Fa. Olympus (Tokyo, Japan) mit ca. 1000facher Vergrößerung, einer damit verbundenen schwarz-weiss-Kamera SSC-M 370 CE der Fa. Sony (Tokyo, Japan) einem Kontrollmonitor der Fa. Sony und einem IBM-kompatiblen Personalcomputer mit Pentium II Prozessor und einer Taktfrequenz von 200 MHz. Als Software wurde der „Cell Morphology Analyser“ in der Version 2.0 für „Windows 95 & Windows NT 4.0“ verwendet. Zur digitalen Aufzeichnung wurden die Spermatozoen über die mit dem Lichtmikroskop verbundene Kamera auf den Ausstrichpräparaten mit Hilfe des Kontrollmonitors im Durchlichtverfahren aufgesucht und scharfgestellt, um dann in den Rechner eingespeichert und digitalisiert zu werden (Wahl, 1984). Daraufhin folgte das Vermessen der Objekte, anhand einer Bildverarbeitung, wobei die Bilder anhand ihrer Grauabstufung analysiert wurden. Hierzu stand eine Auflösung von 800 mal 600 Pixel bei 256 Graustufen zur Verfügung (Ernst, 1991).

2.4.2.1 Konfiguration des Klassifikators

Um mit dem beschriebenen CASA-System die notwendigen Untersuchungen mit dem vorliegenden Material durchführen zu können, wurde ein Klassifikator eingerichtet. Mit diesem sollte eine Klassifizierung nach individuellen Bedürfnissen möglich sein. Zum Beispiel konnten im Vorfeld die Einteilungskriterien der Spermatozoen frei gewählt und konstruiert werden. Nach Einrichtung dieser Kriterien folgte dann der Lernprozess für den neu konfigurierten Klassifikator. Das heisst, den Einteilungskriterien mussten morphologische Korrelate anhand von Beispielen manuell zugeordnet werden. Dazu sucht man auf den zur Verfügung stehenden Spermatozoenausstrichen zu den jeweiligen Klassen eine hinreichende Anzahl von Beispielen, liess sie von der Anlage vermessen, gab die richtige Klassifizierung manuell ein und archivierte somit die Lernbeispiele im Lernspeicher. Anhand dieser Datensätze war es dem CASA-System möglich, den Klassifikator zu trainieren und einzurichten. Dieser Lernprozess basierte auf der Grundlage eines neuronalen Netzes, das nach dem Backpropagation-Algorithmus (Kruse et al., 1991) arbeitet. Mit dieser Programmtechnik war der erstellte Klassifikator in der Lage assoziativ und flexibel zu arbeiten (Steigerwald, 1997), um auch vorliegende „Grenzfälle“ zwischen den einzelnen Klassen zuzuordnen. Die Qualität und Leistungsfähigkeit des eingerichteten Klassifikators hing von der Anzahl und Vielfalt der vom Benutzer eingegebenen Beispiele ab (Steigerwald, 1997). Zu wenig angebotene Lerndaten führten z.B. dazu, dass die Grenzen zwischen den einzelnen Klassen nicht richtig abgesteckt werden konnte, aber auch eine Überdimensionierung konnte den Lernerfolg verhindern (Steigerwald, 1997).

In dieser Untersuchung wurden die Klassifikationskriterien in Anlehnung an die Richtlinien der WHO (WHO, 1999) gewählt (vgl. 2.4.1). Somit arbeitete der verwendete Klassifikator mit folgender Einteilung:

- normal
- gross
- klein
- kugelig
- länglich
- amorph

Die Klasse „doppelköpfig“ konnte wegen Schwierigkeiten bei der Bildverarbeitung nicht erfasst werden. Im Rahmen der Datenerhebung stellte sich zudem heraus, dass das System nicht in der Lage war zwischen tropfenförmigen und normalgeformten Spermatozoenköpfen zu unterscheiden, womit auch diese weitere Differenzierung entfiel. Zur Bildung des Klassifikators wurden für jede Klasse 20 Beispiele archiviert, womit dem System 140 Lerndatensätze zur Verfügung standen. Um objektivierte und standardisierte Vermessungsbedingungen zu schaffen und zu erhalten, wurden keine weiteren Lernbeispiele hinzugefügt. Der Klassifikator wurde während der Untersuchung nicht verändert.

2.4.2.2 Auswahl der erhobenen Daten

Die durch das CASA-System erhobenen Daten der Spermatozoenmorphologie konnten in Form einer Statistik angezeigt werden. Diese Darstellung beinhaltete entsprechend des konfigurierten Klassifikators die prozentualen Anteile der einzelnen Klassen von 100 ausgezählten Spermatozoen. Neben diesen Daten wurden für die jeweiligen Klassen auch die durchschnittliche Fläche, Breite und Länge der Köpfe sowie deren Minimal- und Maximalwerte angegeben.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden bis auf die Minimal- und Maximalwerte alle Daten aufgenommen und ausgewertet.

2.5 Statistik

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe von SPSS für Windows Version 8.0. Neben gepaarten wurden auch ungepaarte T-Tests zur Überprüfung der Ergebnisse verwendet. Die graphischen Darstellungen im Zusammenhang mit den erfassten Daten wurden mit diesem System erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtstichprobe

Bei den im Rahmen dieser Erhebung untersuchten 82 Patienten lag bei 42 Personen eine Leukozytospemie vor, während bei der Kontrollgruppe mit 40 Patienten nachweislich keine Leukozytospemie vorlag. Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die Untersuchungs- und Kontrollgruppe bezüglich der Kriterien wie durchschnittliches Alter und mittlere Spermatozoenkonzentration nur geringfügig. So ist beim durchschnittlichen Alter der Patienten eine Differenz von 0,55 Jahren, bei der Spermatozoenkonzentration ein Unterschied von 27,62 mal $10^6/\text{ml}$ von Untersuchungs- zu Kontrollgruppe zu verzeichnen.

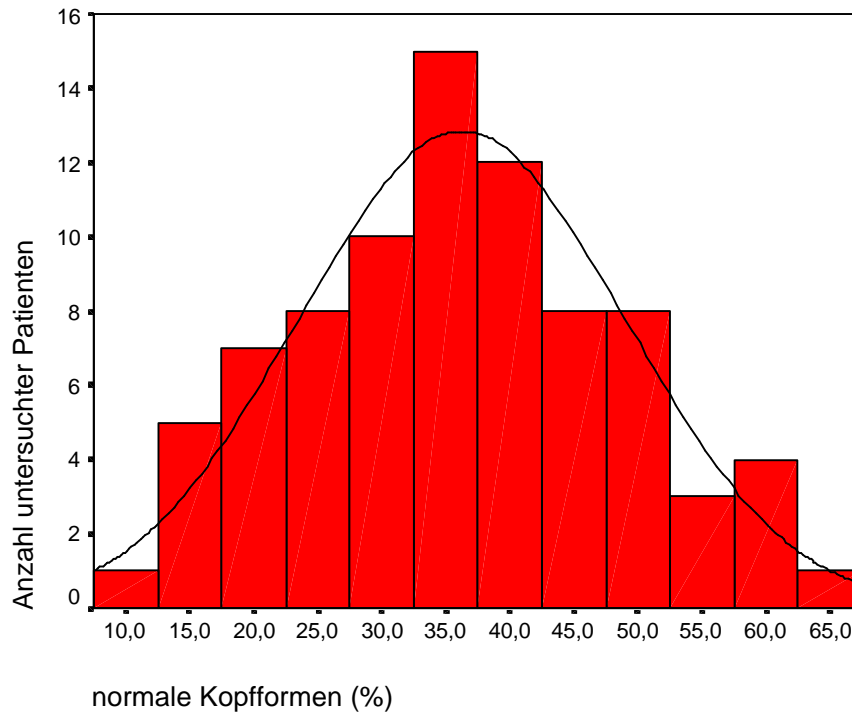
Tab.1 Beschreibung der Gesamtstichprobe

	> 10^6 Leukoz./ml	< 10^6 Leukoz./ml
Anzahl der Patienten	42	40
Alter (MW \pm SD)	36,40 (5,79)	35,85 (5,29)
Spermatozoenkonzentration (MW \pm SD)($10^6/\text{ml}$)	79,57 (70,75)	51,95 (50,08)
Leukozytenkonzentration (MW \pm SD)	18,35 (22,58)	0,13 (0,22)

(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Leukoz.: Leukozyten)

Da die Art der Verteilung der aufgenommenen Daten für die Auswahl später verwendeter Tests eine Rolle spielt, soll die Abb.1 einen Überblick über diese im Vergleich mit einer Normalverteilung geben. Die in Abb.1 über die Ergebnisverteilung gelegte Normalverteilungskurve verdeutlicht, dass die erhobenen Daten einer Normalverteilung annähernd entsprechen, womit die Voraussetzung für die Verwendung später angewandter statistischer Verfahren gegeben ist.

Abb. 1: Histogramm der Prozentsätze normaler Kopfformen aller Präparate im Vergleich zu einer Normalverteilungskurve



Die in Tab.2 aufgeführten Daten geben einen Überblick über die im Gesamtkollektiv aufgenommenen Mittelwerte. Neben den Prozentanteilen der Kopfformen sind auch die verschiedenen Kopfdeformitäten aufgeführt. Zusätzlich werden die jeweiligen durchschnittlichen Flächen sowie entsprechende Längen und Breiten der Spermatozoenköpfe dargestellt. Die Mittelwerte bezüglich der Prozentanteile (Anteil normaler Kopfformen: 36,90%) sowie die Ausmasse (durchschnittliche Fläche bei den normalen Kopfformen: $12,45 \mu\text{m}^2$) hinsichtlich der Länge (normale Kopfform: $4,79 \mu\text{m}$) und Breite (normale Kopfform: $3,33 \mu\text{m}$) entsprechen annähernd vorausgegangenen Messungen mit dem CASA-System (Steigerwald et al., 1998).

Tab. 2: Mittelwerte der verschiedenen Kopfformen von der Gesamtstichprobe

		Normale	Amorphe	Grosse	Kleine	Kugelför.	Längli.
Anteil (%)	Mittelw.	36,90	16,96	13,45	17,68	4,21	10,80
	SD	11,07	6,90	7,10	8,88	2,86	7,32
	Median	36,5	16	12	16,25	4	9,25
	Minimum	9	2	1	3	1	1
	Maximum	66	41	44	45	20	41
Fläche (µm²)	Mittelw.	12,45	18,68	18,66	8,31	12,82	14,19
	SD	0,53	3,77	1,26	0,50	0,93	0,63
	Median	12,5	18,05	18,55	8,25	12,85	14,3
	Minimum	11,0	8,8	16	5,7	9,9	11,8
	Maximum	14,3	28,4	32	9,5	15,6	15,9
Länge (µm)	Mittelw.	4,79	5,99	6,11	3,78	4,29	5,98
	SD	0,13	0,88	0,32	0,17	0,19	0,22
	Median	4,77	5,95	6,1	3,8	4,3	5,95
	Minimum	4,5	3,7	5,2	3,1	3,7	5,5
	Maximum	5,3	9	7,6	4,3	5	7,1
Breite (µm)	Mittelw.	3,33	4,13	4,03	2,77	3,90	3,07
	SD	0,20	0,50	0,29	0,14	0,22	0,18
	Median	3,32	4,1	4	2,75	3,9	3,05
	Minimum	3	3,1	2,7	2,3	3,3	2,4
	Maximum	4,8	6,3	4,9	3,3	5	3,6

(Kugelför.: Kugelförmige; Längli.: Längliche; Mittelw.: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

3.2 Anteile der Spermatozoenkopfformen

Bei den normalen Spermatozoenkopfformen konnte bei Vergleich der ersten mit der zweiten Messung kein signifikanter Effekt ($p=0,98$) beobachtet werden (vgl. Abb. 2). Bei Vergleich der Gruppe mit Leukozytospemie mit der Kontrollgruppe ohne Leukozytospemie war hinsichtlich des Anteils normal geformter Spermatozoenköpfe kein signifikanter Effekt ersichtlich ($p=0,06$; vgl. Abb. 3). Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse bezüglich der Anteile der verschiedenen Spermatozoenkopfformen. Die Ergebnisse der statistischen Tests beschreiben vorliegende Veränderungen und deren Signifikanz. Neben gepaarten T-Tests zum Vergleich der 1. Messung mit der 2. Messung (U_1 mit U_2 ; K_1 mit K_2) wurden auch ungepaarte T-Tests für den Vergleich der Untersuchungs- mit der Kontrollgruppe durchgeführt (U mit K). Bei den kleinen Spermatozoenkopfformen (vgl. Tab. 3) beobachteten wir einen signifikant kleineren Anteil bei der Untersuchungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,02$). Im Mittel war der Anteil kleiner Spermatozoenkopfformen in der Gruppe mit Leukozytospemie um 4,7 % niedriger. Bei anderen Deformitäten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Abb. 2: Veränderung des Anteils der „normalen“ Spermatozoenköpfe von der 1. zur 2. Messung

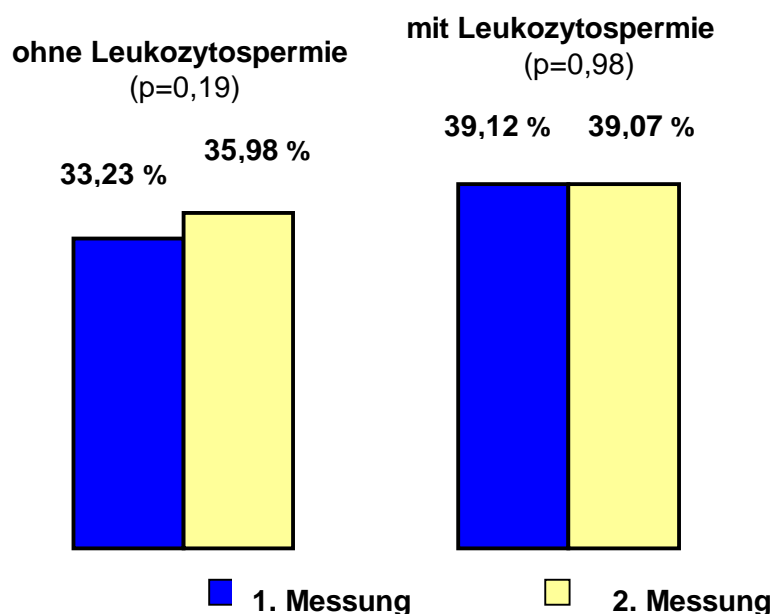
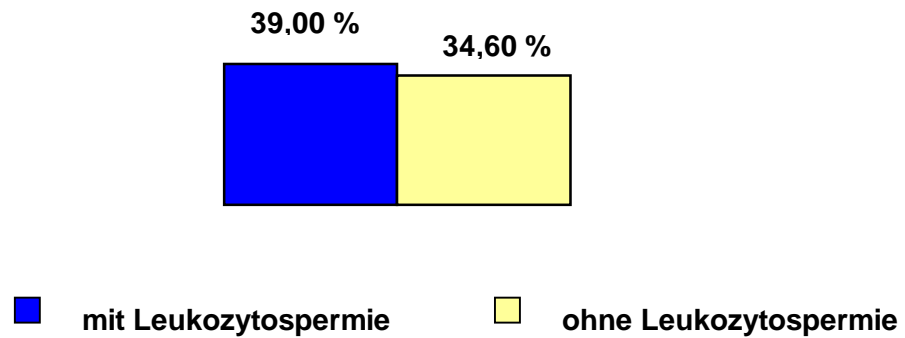


Abb. 3: Vergleich der normalen Spermatozoenkopfanteile der Untersuchungs- mit der Kontrollgruppe (p=0,06)



Tab. 3 Mittelwerte der Prozentsätze (\pm SD) der verschiedenen Kopfformen

Kopfform	Untersuchungsgr. (U) (n=42)		Kontrollgr. (K) (n=40)		Vergleich			
	U ₁ (1. Mess.)	U ₂ (2. Mess.)	K ₁ (1. Mess.)	K ₂ (2. Mess.)		U ₁ ;U ₂	K ₁ ;K ₂	U;K
normal	39,11 \pm 13,30	39,07 \pm 13,09	33,23 \pm 13,07	35,96 \pm 13,28	T p	0,02 0,98	-1,35 0,19	1,87 0,06
gross	14,45 \pm 7,98	14,90 \pm 7,52	11,65 \pm 9,01	12,65 \pm 9,13	T p	0,35 0,73	0,61 0,54	1,63 0,10
klein	15,05 \pm 8,90	15,71 \pm 8,61	21,73 \pm 10,95	18,45 \pm 10,56	T p	0,41 0,68	1,40 0,17	-2,47 0,02
kugelig	3,81 \pm 3,38	3,67 \pm 2,67	4,53 \pm 3,78	4,88 \pm 3,99	T p	0,22 0,83	0,50 0,65	-1,54 0,13
länglich	10,98 \pm 5,58	11,38 \pm 6,90	10,68 \pm 9,00	10,15 \pm 6,70	T p	0,33 0,74	0,57 0,56	0,47 0,64
amorph	16,60 \pm 9,23	15,26 \pm 8,04	18,20 \pm 7,13	17,90 \pm 8,41	T p	1,08 0,29	0,26 0,82	-1,40 0,17

(SD: Standardabweichung)

3.3 Flächenausdehnungen der Spermatozoonkopfformen

Bei Betrachtung der Spermatozoonkopfflächen (s. Tab. 4) massen wir bei Vergleich der Untersuchungs- mit der Kontrollgruppe signifikant grössere Kopfflächen bei den länglichen Spermatozoonköpfen in der Untersuchungsgruppe ($p=0,01$). Im Mittel war die Fläche bei den Patienten mit Leukozytospemie um $0,37 \mu\text{m}^2$ grösser als bei der Kontrollgruppe. Bei Vergleich der Ergebnisse der ersten und der zweiten Untersuchung der Kontrollgruppe fiel eine signifikant grössere Spermatozoonkopffläche der normal geformten Spermatozoonköpfe zum zweiten Messzeitpunkt auf ($p=0,05$). Im Mittel war die Fläche der normal geformten Spermatozoonköpfe in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der zweiten Messung um $0,25 \mu\text{m}^2$ grösser als bei der ersten Messung.

Tab. 4 Mittelwerte der Spermatozoonkopfflächen ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$) der verschiedenen Kopfformen

Kopfform	Untersuchungsgr. (U) (n=42)		Kontrollgr. (K) (n=40)		Vergleich			
	U ₁ (1. Mess.)	U ₂ (2. Mess.)	K ₁ (1. Mess.)	K ₂ (2. Mess.)		U ₁ ;U ₂	K ₁ ;K ₂	U;K
normal	12,40 $\pm 0,73$	12,47 $\pm 0,61$	12,26 $\pm 0,64$	12,51 $\pm 0,71$	T p	0,62 0,54	-1,98 0,05	0,38 0,71
gross	18,65 $\pm 1,38$	18,22 $\pm 0,94$	18,71 $\pm 1,62$	18,88 $\pm 1,78$	T p	1,91 0,06	0,39 0,70	-1,19 0,24
klein	8,36 $\pm 0,70$	8,49 $\pm 0,60$	8,29 $\pm 0,67$	8,29 $\pm 0,83$	T p	0,78 0,44	0,00 1,00	1,31 0,20
kugelig	13,00 $\pm 1,20$	12,91 $\pm 1,31$	12,79 $\pm 1,11$	12,67 $\pm 1,10$	T p	0,27 0,78	0,65 0,52	1,22 0,23
länglich	14,40 $\pm 0,77$	14,38 $\pm 0,71$	14,06 $\pm 0,91$	14,04 $\pm 0,85$	T p	0,11 0,91	0,24 0,81	2,74 0,01
amorph	18,78 $\pm 4,76$	18,56 $\pm 4,24$	18,12 $\pm 4,27$	19,25 $\pm 4,43$	T p	0,26 0,82	-1,30 0,20	0,02 0,99

(SD: Standardabweichung)

3.4 Längenausdehnungen der Spermatozoenkopfformen

Bei Vergleich der Ergebnisse der ersten Messung mit der zweiten Messung der Kontrollgruppe fiel eine signifikante Längenzunahme der grossen Spermatozoenköpfe um im Mittel 0,23 μm auf ($p=0,01$). Weitere Effekte hinsichtlich der Längenausdehnung von Spermatozoenköpfen konnten nicht festgestellt werden (s. Tab. 5).

Tab. 5 Mittelwerte der Spermatozoenkopflängen ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) der verschiedenen Kopfformen

Kopfform	Untersuchungsgr. (U) (n=42)		Kontrollgr. (K) (n=40)		Vergleich			
	U ₁ (1. Mess.)	U ₂ (2. Mess.)	K ₁ (1. Mess.)	K ₂ (2. Mess.)		U ₁ ;U ₂	K ₁ ;K ₂	U;K
normal	4,82 $\pm 0,20$	4,78 $\pm 0,15$	4,76 $\pm 0,19$	4,80 $\pm 0,18$	T p	1,00 0,32	0,60 0,55	0,44 0,66
gross	6,20 $\pm 0,49$	6,25 $\pm 0,45$	6,11 $\pm 0,50$	6,33 $\pm 0,57$	T p	0,61 0,55	-2,62 0,01	0,05 0,96
klein	3,76 $\pm 0,24$	3,85 $\pm 0,23$	3,83 $\pm 0,21$	3,79 $\pm 0,27$	T p	-1,40 0,17	0,73 0,47	0,00 1,00
kugelig	4,26 $\pm 0,28$	4,29 $\pm 0,30$	4,29 $\pm 0,20$	4,32 $\pm 0,26$	T p	0,64 0,53	0,18 0,86	0,23 0,82
länglich	6,01 $\pm 0,31$	5,98 $\pm 0,22$	5,96 $\pm 0,27$	6,00 $\pm 0,31$	T p	0,50 0,62	0,71 0,48	0,26 0,79
amorph	6,01 $\pm 1,16$	6,06 $\pm 1,18$	5,93 $\pm 0,84$	6,14 $\pm 1,13$	T p	0,17 0,87	0,93 0,36	0,02 0,98

(SD: Standardabweichung)

3.5 Breitenausdehnungen der Spermatozoenkopfformen

Bei Vergleich der Ergebnisse der ersten Messung mit denen der zweiten Messung (vgl. Tab. 6) konnte bei der Untersuchungsgruppe eine signifikante Verringerung der Breitenausdehnung bei den grossen Spermatozoenkopfformen zum zweiten Messzeitpunkt beobachtet werden ($p=0,03$). Im Mittel nahm die Kopfbreite bei dieser Deformität um $0,1\text{ }\mu\text{m}$ ab. Bei Vergleich der Ergebnisse der Gruppe mit Leukozytospemie mit denen der Kontrollgruppe lag eine signifikante Verbreiterung der länglichen Spermatozoenköpfe in der Gruppe mit Leukozytospemie vor ($p=0,04$). Im Durchschnitt war die Differenz $0,08\text{ }\mu\text{m}$ gross. Auch bei den kleinen Kopfformen konnte eine durchschnittlich grössere Kopfbreite bei der Untersuchungsgruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe gemessen werden ($p=0,05$). Im Mittel waren die kleinen Spermatozoenköpfe um $0,06\text{ }\mu\text{m}$ breiter in der Gruppe mit Leukozytospemie (vgl. Tab. 6).

Tab. 6 Mittelwerte der Spermatozoenkopfbreiten ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) der verschiedenen Kopfformen

Kopfform	Untersuchungsgr. (U) (n=42)		Kontrollgr. (K) (n=40)		Vergleich			
	U ₁ (1. Mess.)	U ₂ (2. Mess.)	K ₁ (1. Mess.)	K ₂ (2. Mess.)		U ₁ ;U ₂	K ₁ ;K ₂	U;K
normal	3,30 $\pm 0,30$	3,36 $\pm 0,30$	3,25 $\pm 0,19$	3,31 $\pm 0,17$	T p	1,15 0,24	-1,84 0,07	1,14 0,26
gross	3,98 $\pm 0,31$	3,88 $\pm 0,26$	4,02 $\pm 0,48$	3,99 $\pm 0,42$	T p	2,22 0,03	0,57 0,57	-1,00 0,32
klein	2,78 $\pm 0,16$	2,81 $\pm 0,16$	2,74 $\pm 0,19$	2,75 $\pm 0,21$	T p	0,85 0,40	0,26 0,77	1,93 0,05
kugelig	3,92 $\pm 0,28$	3,83 $\pm 0,75$	3,86 $\pm 0,25$	3,91 $\pm 0,33$	T p	0,74 0,46	0,17 0,87	1,60 0,12
länglich	3,11 $\pm 0,21$	3,12 $\pm 0,20$	3,06 $\pm 0,25$	3,03 $\pm 0,24$	T p	0,14 0,89	0,70 0,49	2,07 0,04
amorph	4,19 $\pm 0,60$	4,07 $\pm 0,469$	4,06 $\pm 0,69$	4,16 $\pm 0,50$	T p	1,15 0,26	0,99 0,33	0,20 0,84

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Hinsichtlich des Anteils der normal geformten Spermatozoenköpfe lag kein signifikanter Effekt der Leukozytospemie auf die humane Spermatozoenkopfmorphologie vor. Bei Beobachtung auf Veränderung der morphologischen Qualität zwischen zwei Messzeitpunkten war die Veränderung mit einer Abnahme der normal geformten Spermatozoen um 0,05 % ($p=0,98$) nur gering. Bei dem direkten Vergleich der Untersuchungsgruppe mit der Kontrollgruppe war der Anteil der normal geformten Spermatozoen in der Untersuchungsgruppe (mit Leukozytospemie) um 4,5 % ($p=0,07$) höher und widersprach der Annahme eines negativen Effektes auf diesen Parameter. Bei den anderen Kopf-Klassifikationsparametern war bezüglich ihrer Anteile beim Vergleich der 1. mit der 2. Messung kein signifikanter Effekt ersichtlich. Betrachtet man die Veränderungen beim Vergleich der Untersuchungsgruppe mit der Kontrollgruppe, so ergab sich ein um 4,7 % geringerer Anteil der kleinen Spermatozoenkopfformen in der Gruppe mit Leukozytospemie ($p=0,02$). Dieser Unterschied entspricht tendenziell dem nicht signifikant höheren Anteil der normal geformten Spermatozoenköpfe in der Untersuchungsgruppe, weswegen man mutmassen kann, dass der Anteil der normalen Kopfform unter Leukozytospemie auf Kosten der kleinen Kopfform zugenommen hat. Bei Beobachtung der Ausmasse von Spermatozoenköpfen fällt bei dem Vergleich auf Veränderung von der ersten zur zweiten Messung eine Breitenabnahme der grossen Spermatozoenköpfe um durchschnittlich $0,1 \mu\text{m}$ ($p=0,03$) auf. Die mittlere Fläche und die Länge dieses Klassifikations-Subtypen verändern sich jedoch nicht signifikant. Bei Betrachtung der Kontrollgruppe tritt beim Vergleich der ersten mit der zweiten Messung eine signifikante Längenzunahme um $0,23 \mu\text{m}$ ($p=0,01$) der grossen Spermatozoenköpfe auf. Der Vergleich der Untersuchungsgruppe mit der Kontrollgruppe zeigt eine signifikante Breitenzunahme der länglichen Spermatozoenköpfe um $0,08 \mu\text{m}$ ($p=0,04$) bei signifikanter Flächenzunahme dieses Subtypus um $0,37 \mu\text{m}^2$ ($p=0,01$). Die aus dieser Erhebung vorgestellten Ergebnisse hinsichtlich der signifikanten

Veränderungen bei den Spermienköpfen sind als sehr unspezifisch zu beschreiben und müssen kritisch betrachtet werden. Auch wenn diese Veränderungen durch statistische Tests als signifikant einzuordnen sind, so liegt die Vermutung nahe, dass diese Effekte evtl. durch andere Einflussfaktoren und nicht durch eine Leukozytospemie erwirkt sein könnten. Denn bei Vorliegen der unerwarteten signifikanten Effekte bei der Kontrollgruppe, denen keine bekannte Einflussgrösse zuzuordnen ist, sollte die Anwesenheit einer Störgrösse als Ursache signifikanter Veränderungen der Untersuchungsgruppe beider Vergleichsmethodiken in Betracht gezogen werden. Die Datenlage dieser Erhebung bestätigt die Ergebnisse anderer Studien (vgl.1.2.5), dass eine Leukozytospemie keinen negativen Einfluss auf den Anteil normal geformter Spermatozoenköpfe hat.

4 Diskussion

4.1 Die angewendete Methodik

In der vorliegenden Arbeit sollten Kenntnisse über die Beeinträchtigung der Morphologie von humanen Spermatozoen im Rahmen einer Leukozytospemie gewonnen werden. Es liegen viele Untersuchungen mit unterschiedlichsten Ergebnissen zu dieser Fragestellung vor, jedoch sollte bei der Mehrzahl der Erhebungen die Anwendung und Wahl der Methoden kritisch betrachtet werden (vgl. 1.2.4). So wurde bei einigen Studien die Qualität der Leukozytendetektion qualitativ als auch quantitativ in Frage gestellt (Wolff 1995). Alle bisherigen Erhebungen haben die Wahl der visuellen Morphologieauswertung als verwendete Methode gemeinsam (Wolff 1995). Die Besonderheit der hier vorgestellten Ergebnisse liegt in der Anwendung eines CASA-Systems zur morphologischen Befunderhebung. Im Folgenden wird kritisch der Untersuchungsaufbau und der Einsatz des hier verwendeten CASA-Systems erläutert.

4.1.1 Der Untersuchungsaufbau

Die Konzeption des Studiendesigns berücksichtigte die Auswertung der morphologischen Daten mit zwei methodischen Ansätzen. So wurde basierend auf der Kenntnis der Zeitdauer der Spermatogenese vorausgesetzt, dass ein Einfluss einer Leukozytospemie zu frühen Zeitpunkten der Spermienentwicklung erst verspätet im Ejakulat zu erkennen ist. Deshalb mussten zwischen zwei Zeitpunkten mindestens zwei Monate liegen. Voraussetzung war bei dieser Untersuchung, dass zu beiden Zeitpunkten eine Leukozytospemie vorlag, um gegebenenfalls eine Verschlechterung oder Verbesserung der morphologischen Qualität eruieren zu können. Ein weiterer methodischer Ansatz setzte voraus, dass ein positiver, negativer oder nicht

vorhandener Einfluss auf die Morphologie der Spermatozoen unabhängig von der Zeitdauer der Leukozytospermie direkt messbar ist. Eine kritische Betrachtung beider Methoden verdeutlicht, dass sowohl der eine als auch der andere Ansatz nicht unproblematisch sind. Bei der Überlegung, dass man einen Effekt der Leukozytospermie über einen längeren Zeitraum untersuchen möchte, ist zu hinterfragen, ob –wie in diesem Zusammenhang- die Leukozytospermie auch tatsächlich mindestens 2 Monate anhielt. In der vorliegenden Erhebung lag der Nachweis einer Leukozytospermie lediglich zu beiden Messzeitpunkten vor, in dem Zeitraum dazwischen wurden keine Leukozytennachweise im Ejakulat durchgeführt. Sollte sich in dem Zeitraum zwischen den Datenerhebungen die Leukozytospermie zurückgebildet haben, wäre der methodische Ansatz des Studienkonzeptes hinfällig. Desweiteren liegt die kritische Überlegung nahe, dass möglicherweise schon zum ersten Messzeitpunkt das Maximum einer morphologischen Verschlechterung der Spermatozoen erreicht ist, da eine Leukozytospermie schon längere Zeit vor der ersten Messung vorgelegen hat und somit kein weiterer negativer Effekt in dem folgenden Zeitraum zu erwarten wäre. Selbst eine Verbesserung wäre nach Vorstellung von Baker et al. (1985) möglich, die eine Regression zu Mittelwerten beschreiben. Baker et al. (1985) untersuchten die Ejakulatqualität von 216 Männern zu zwei Zeitpunkten und stellten bei jenen mit geringer Spermienkonzentration und Motilität eine signifikante Verbesserung der Parameter bei einer zweiten Messung fest, während bei den Spendern mit normalen Spermienparametern keine Verbesserung eintrat. Baker et al. (1985) erklären diesen Effekt mit einer Regression zu Mittelwerten. Die Wahrscheinlichkeit für eine Verbesserung von Parametern sei somit bei einer Ausgangslage mit schlechter Ejakulatqualität höher als mit normalen Spermatozoenparametern. Es ist somit fraglich, ob die Zielgrösse „Verbesserung oder Verschlechterung“ von Morphologiekriterien vor diesem Hintergrund sinnvoll ist; denn vor den angemerkten Hintergründen müssten Untersuchungen auf Leukozytospermie in einem Zeitraum vor der ersten Messung stattfinden, um eine evtl. Verschlechterung der Ejakulatqualität im Vorfeld auszuschliessen. Zusätzlich müsste auch das Fortwähren der

Leukozytospemie in dem Zeitraum zwischen der ersten und der zweiten Messung überprüft werden. Fraglich ist jedoch, inwiefern eine Überprüfung auf Leukozytospemie vor und während der Erhebung möglich und praktikabel sein soll. Diese zusätzlichen Untersuchungen bedeuteten eine enorme Aufwands- und Kostenerhöhung und lassen sich nicht mit der tatsächlich für den Patienten notwendigen Diagnostik vereinbaren. Der direkte Vergleich der „Normalen-Anteile“ einer Untersuchungsgruppe mit Leukozytospemie mit denen einer Kontrollgruppe ist bezüglich der Problematik „Regression towards the mean“ (Baker et al. 1985) (s.o.) weniger kritisch zu betrachten, da hier nicht Verbesserungen oder Verschlechterungen der Spermatozoenmorphologie im Vordergrund stehen, sondern nur mittlere Anteile der normal geformten Spermatozoen im Vergleich mit einer Kontrollgruppe ohne Leukozytospemie. Vorteil dieser Methodik ist auch die nicht vorhandene Notwendigkeit einer Überprüfung auf konstantes Fortbestehen einer Leukozytospemie während des Untersuchungszeitraums. Fraglich ist allerdings, ob ein Einfluss auf die Morphologie schon zum Zeitpunkt der Ejakulatgewinnung besteht.

4.1.2 Das CASA-System

Das CASA-System der Firma Mika medical kam den gestellten Ansprüchen bezüglich der zu untersuchenden Fragestellung nicht in allen Belangen nach. Die Anlage war nicht in der Lage Daten hinsichtlich der tropfenförmigen Spermienköpfe zu erheben, welche sie tendenziell zu den normal- und kugelförmigen Spermatozoen klassifizierte. Das bedeutet, dass Anteile anderer Kopfformen falsch erhöht sein könnten und Effekte, die sich mit dieser Kopfform manifestieren verkannt wurden. Die Klassifikation der übrigen Kopfformen verlief unproblematisch und musste nur selten manuell nachkorrigiert werden. Diese Nachkorrekturen bezogen sich jedoch nicht auf Fehler bei der Kopfklassifikation durch den Computer, sondern eher auf die Systemkonfiguration zur Ermittlung von hellen und dunklen Signalen mit der

Kamera, da jedes Ausstrichpräparat verschieden dunkel oder hell war. Nach Korrektur der Grundeinstellung und Einstellung auf die Qualität des Präparates mussten keine manuellen Klassifikationen vorgenommen werden. Wie bei Steigerwald et al. (1998), die das gleiche System verwendeten, waren die Mittelstücke auch in dieser Untersuchung nicht zu vermessen und Veränderungen bezüglich dieses Parameters nicht überprüfbar. Die Spermatozoenschwanzdetektion stellte sich als ungenügend heraus. Die wechselhafte Qualität der Ausstrichpräparate liess ein automatisiertes Erkennen der Schwänze nicht zu, weshalb die Klassifikation der Spermischwanzmorphologie fast ausschliesslich manuell zu verrichten war. Die positiven Effekte durch Anwendung eines CASA-Systems lagen bezüglich des Parameters Schwanzmorphologie nicht vor. Alleiniger Vorteil dieser zusätzlich zum klinischen Alltag vorgenommenen zweiten Schwanzklassifikation war die Vermessung durch nur einen Untersucher.

4.2 Der Einfluss einer Leukozytospemie auf die Spermatozoenmorphologie

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein signifikanter Einfluss einer Leukozytospemie auf die Morphologie humaner Spermatozoen dargestellt werden. Bisherige Veröffentlichungen kamen zu verschiedenen Ergebnissen. Bei einem Grossteil der vorgenommenen Untersuchungen konnte der Einfluss auf die Morphologie von Spermien nur durch Angabe des Anteils normal geformter Spermatozoen beschrieben werden. Konkretere Angaben zur Art der möglichen Morphologieveränderungen im Rahmen von Infektionen des Urogenitaltraktes sollen im folgenden diskutiert und erläutert werden.

Menkveld et al. (1998) beschrieben eine Beeinträchtigung der Spermienkopfmorphologie durch einen Anstieg des Anteils „länglicher“ Kopfformen bei Vorhandensein von Leukozyten im Ejakulat. Bei kritischer Betrachtung dieser Erhebung fällt die sehr niedrige Fallzahl für die Untersuchungsgruppe mit vorliegenden Leukozyten im Ejakulat auf. Die Untersuchungsgruppe enthielt 16 Patienten, während die Kontrollgruppe von 134 Männern gebildet wurde. Desweiteren waren die Leukozytenkonzentrationen bei einigen Patienten sehr niedrig. Von 16 Patienten lag bei nur fünf Männern die Leukozytenkonzentration über 10^6 Leukozyten/ml Ejakulat, bei drei Patienten zwischen 0,5 und 0,99 mal 10^6 und bei 5 Männern zwischen 0,01 und 0,49 mal 10^6 Leukozyten/ml Ejakulat. Die Signifikanz des Einflusses der Leukozyten auf die Morphologie war bei Beschränkung auf eine definitionsgemässe Leukozytospemie nicht mehr ersichtlich. Die bei diesem Vergleich hinzugezogene Untersuchungsgruppe enthielt nur 10 Patienten. Toth et al. (1982) beobachteten 243 Patienten mit Ureaplasma urealyticum Infektion. Sie behandelten die Patienten mit verschiedenen Doxycyclin-Therapie-Schemata und verglichen die Ejakulatqualität vor und nach der Therapie miteinander. Ergebnis dieser Erhebung war eine Verbesserung der Ejakulatqualität hinsichtlich der Motilität

und Konzentration der Spermatozoen jedoch ein signifikanter Anstieg des Anteils der kleinen Kopfformen nach durchgeführter Therapie. Ein Anstieg der kleinen Kopfformen wurde unter Doxycyclinthherapie bei der Kontrollgruppe (n=150) nicht beobachtet und soll damit nicht durch die antibiotische Therapie verursacht sein. Dieses Ergebnis kann durch unsere Untersuchung bestätigt werden; denn auch wir fanden eine signifikante Abnahme des Anteils der kleinen Spermatozookopfformen vor. Veränderungen bei den länglichen Kopfformen wurden mit der Untersuchung von Toth et al. (1982) nicht bestätigt. Eine Studie von Leib et al. (1994) stellte bei Untersuchung von Männern mit abakterieller Prostatitis eine signifikante Verschlechterung der Morphologie fest. Der Anteil der normal geformten Spermatozoen war bei ihnen erniedrigt. Auch ein Anstieg der Mittelstück- und Schwanzdefekte war nach Leib et al. (1994) ersichtlich. Die Untersuchungsgruppe beinhaltete 44 Patienten, die mittlere Leukozytenkonzentration lag bei $1,5 \times 10^6$ Leukozyten/ml Ejakulat. Eine genauere Defektbeschreibung wurde in dieser Studie nicht vorgenommen, womit ein Vergleich mit unseren Ergebnissen erschwert ist. Einflüsse auf die Kopfmorphologie waren jedoch erst bei nach über drei Jahre bestehender abakterieller Prostatitis festzustellen. Lag die Zeitdauer der bestehenden Erkrankung unter drei Jahren, waren die Effekte nicht als signifikant zu beschreiben. Xu et al. (1997) untersuchten den Zusammenhang einer Ureaplasma urealyticum Infektion und Infertilität. Xu et al. (1997) erhoben hierzu Ejakulatparameter von 1416 infertilen und 375 fertilen Männern. Bei 549 Infertilen konnte eine Ureaplasma urealyticum Infektion diagnostiziert werden. Bei 35-75% der Spermatozoen dieser Männer lagen aufgerollte Schwänze vor. Elektronenmikroskopisch konnten Ureaplasmen-Adhäsionen an der Spermatozoenoberfläche vor allen Dingen im Mittelstückbereich eruiert werden. Mittelwerte sind der Veröffentlichung nicht zu entnehmen, womit die Validität der beschriebenen Effekte eingeschränkt ist. Auch Franco et al. (1984) stellten Adhäsionen der Mykoplasmen im Mittelstück sowie im vorderen Bereich aufgerollter Spermatozoenschwänze fest. Das untersuchte Kollektiv mit Mykoplasmeninfektionen bildeten 56 Männer. Die Adhärenz anderer Bakterien wie Chlamydia trachomatis wurde von Wølnner-Hanssen et al. (1984)

nachgewiesen. In ihrer Erhebung überprüften sie zusätzlich den Einfluss dieser Adhärenz von Chlamydien auf die mikroskopisch sichtbare Morphologie. So konnten Wølner-Hanssen et al. (1984) keinen Einfluss auf die Morphologie der Spermatozoen beobachten. Nähere Angaben zur Anzahl der untersuchten Patienten lassen sich der Veröffentlichung nicht entnehmen. Soffer et al. (1990) erhoben Daten von 175 Patienten. Bei 84 Männern lag eine kulturpositive Chlamydia trachomatis Infektion vor im Gegensatz zu 91 Patienten, die eine Kontrollgruppe bildeten. Die Gruppen wurden miteinander verglichen. Es konnte kein kleinerer Anteil der normal geformten Spermatozoen bei der Untersuchungsgruppe festgestellt werden. Der Anteil der normal geformten Spermatozoen ist der alleinige aufgenommene Parameter zur Beschreibung der Morphologie in dieser Veröffentlichung gewesen. In einer Untersuchung von Depuydt et al. (1998) konnte ein höherer Anteil abnormer Spermatozoenformen bei 440 Patienten mit Prostatitis beobachtet werden. Dieser Zusammenhang wurde als signifikant erklärt, jedoch sind der Veröffentlichung keine näheren Daten zu entnehmen. Zusätzlich erhoben Depuydt et al. (1998) die Konzentration an Sauerstoffradikalen im Ejakulat bei Patienten mit Prostatitis, bei Männern mit nachgewiesener Leukozytospemie und ohne Leukozytospemie. Die Sauerstoffradikalkonzentration war signifikant erhöht bei den Gruppen mit Leukozytospemie und Prostatitis ($P < 0,0001$). Depuydt et al. (1998) postulieren einen Einfluss der Sauerstoffradikale auf die Spermatozoenmembranen, indem dort das Fett-Säuren-Verhältnis bei Verlust ungesättigter Fettsäuren verändert wird. Ein direkter Zusammenhang mit den mikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen wird von Depuydt et al. (1998) nicht beschrieben.

Die von uns durchgeführte Untersuchung konnte eine beschriebene Veränderung des Anteils der kleinen Spermatozoonkopfformen (Toth et al., 1982) bestätigen. Negative Veränderungen wie eine Erhöhung des Anteils der länglichen Spermatozoen (Kruger et al., 1998) oder eine Verminderung des Anteils der normalen Spermatozoonköpfe (vgl. 1.2.4) waren in unserer Untersuchung nicht darstellbar. Mögliche Defekte der Mittelstücke (Leib et al.,

1994) und der Schwänze (Leib et al., 1994; Xu et al., 1997) von Spermien im Rahmen einer Leukozytospermie oder eines infektiösen Geschehens konnten durch technische Einschränkungen des CASA-Systems nicht nachvollzogen werden.

4.3 Schlussfolgerungen

Die Erwartungen an die durchgeführte Untersuchung wurden nur teilweise erfüllt. Die mit dem CASA-System ermittelten Daten erlaubten nur bedingt eine Klärung der in 1.4 geschilderten Fragestellungen. Die beschriebenen Schwierigkeiten mit dem CASA-System limitierten die aufnehmbaren Parameter. Die Auswertung der Messdaten dieser Erhebung ergab, dass die Leukozytospermie keinen Einfluss auf den Anteil der Spermatozoen mit normaler Kopfmorphologie hatte. Von den messbaren Subtypen der Spermatozonenkopfformierungen konnte lediglich bei den kleinen Kopfformen eine signifikante Veränderung des Anteils festgestellt werden. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nur bei direktem Vergleich der Untersuchungsgruppe mit der Kontrollgruppe, während gepaarte Vergleiche zweier Messungen diesen Einfluss nicht bestätigen konnten. Da bezüglich der Zielgrösse (Anteil der normalen Spermatozonenköpfe) die Ergebnisse beider Vergleichsmethoden einheitlich sind, ist die Aussage des nicht vorhandenen Einflusses auf diese Grösse in unserer Erhebung relativ sicher zu machen. Da in erster Linie dieser Parameter der Morphologie relevant für die Fertilität ist, kann die Bedeutung einer Leukozytospermie bezüglich der Morphologie humaner Spermatozoen als gering betrachtet werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob die Morphologie humaner Spermatozoen durch eine Leukozytospemie beeinträchtigt wird. Die bisher durchgeführten Untersuchungen zu dieser Fragestellung kamen zu uneinheitlichen Ergebnissen. In vergleichbaren Erhebungen lässt die Wahl der verwendeten Methoden zur Leukozytendetektion und der morphologischen Vermessung der Spermatozoen an den gewonnenen Daten zweifeln. In der vorliegenden Untersuchung sollte durch Einsatz eines Computer-Assisted-Semen-Analysis(CASA)-System mit computergestützter morphologischer Vermessung und Analyse der Spermatozoen ein hohes Mass an Objektivität, sowie eine höhere Anzahl ermittelbarer Parameter erreicht werden.

Die Ejakulate von 82 Patienten wurden mit dem CASA-System ausgewertet. Die Untersuchungsgruppe enthielt 42 Patienten mit Leukozytospemie ($>10^6$ Leukozyten/ml). Die Kontrollgruppe bildeten 40 Patienten ohne Leukozytospemie ($<10^6$ Leukozyten/ml). Jeder Patient wurde ein zweites Mal nach mindestens 2 Monaten, aber nicht später als nach 12 Monaten untersucht. Es wurden nur Patienten in die Untersuchungsgruppe aufgenommen, die auch zum zweiten Zeitpunkt der Messung eine Leukozytospemie aufwiesen. Die Leukozyten wurden mit Hilfe der Peroxidase-Färbung identifiziert. Die Ejakulatausstriche wurden entsprechend der Methode nach Papanicolaou gefärbt und nach den Kriterien der WHO ausgewertet. Wir verglichen die Prozentanteile von Spermatozoen mit verschiedenen Kopf- und Schwanzformen der beiden Messungen innerhalb der Untersuchungs- und der Kontrollgruppe sowie beide Kollektive miteinander.

Die Untersuchungsgruppe mit 42 Patienten bei vorliegender Leukozytospemie zeigte keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Prozentanteils der Spermatozoen mit normaler Kopfform von der ersten zur zweiten Messung. In der Kontrollgruppe konnten wir keine signifikant höheren

Anteile der normalen Kopfform zu beiden Zeitpunkten feststellen. Bis auf eine signifikante Verringerung des Prozentanteils der kleinen Spermatozoonkopfformen bei der Untersuchungsgruppe lagen keine Veränderungen der abnormen Kopfformen bei einer der beiden Gruppen vor. Die Ergebnisse hinsichtlich der Spermatozoenschwanzmorphologie waren aufgrund von technischen Problemen mit dem CASA-System nicht mit der notwendigen Validität einbeziehbar.

In dieser Erhebung konnte kein negativer Effekt einer Leukozytospemie auf den Anteil normal geformter Spermatozoonköpfe gefunden werden. Einer Leukozytospemie kann als Ursache morphologischer Veränderungen von Spermatozoonköpfen im Rahmen einer Infertilitätsdiagnostik keine besondere Bedeutung beigemessen werden.

6 Literaturverzeichnis

Aitken RJ, West K, Buckingham D: Leucocytic infiltration in the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. J Androl 1994;15: 343-352

Anderson DJ, O'Brian TR, Politch JA, Martinez A, Seage GR, Padian N et al.: Effects of disease stage and zidovudine therapy on the detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen. J Am Med Assoc 1992; 267: 2769-2774

Anderson DJ, Wolff H, Zhang W, Pudney J: Immunology of the male reproductive tract: implications for the sexual transmission of human immunodeficiency virus. In: Voeller B, Reinisch JM, Gottlieb M: AIDS and sex. An integrated biomedical and biobehavioural approach. New York, Oxford: Oxford University Press, 1990: 311-333

Aumüller G: Spermatogenese. In Krause W., Rothauge CF (Hrsg.), Andrologie. Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane (2. Auflage), Stuttgart: Enke, 1991, 8-15

Aumüller G, Riva A: Morphology and functions of the human seminal vesicle. Andrologia 1992; 24: 183-196

Auroux M, Collin C, Couvillers ML: Do nonspermatozoal cells mainly stem from spermatogenesis ? Study of 106 fertile and 102 subfertile men. Arch Androl 1985; 14: 73-80

Ayodeji O, Baker HWG: Is there a specific abnormality of sperm morphology in men with varicoceles? Fertil Steril 1986; 45: 839-845

Baker HWG, Kovacs GT: Spontaneous improvement in semen quality: regression to the mean. *Int J Androl* 1985; 8: 421-426

Barrat CLR, Robinson A, Spencer RC, Konghorn GR, White A, Harrison PE et al.: Seminal peroxidase positive cells are not an adequate indicator of asymptomatic urethral genital infection. *Int J Androl* 1990; 13: 361-368

Berger RE, Alexander ER, Monda GD, Ansell J, McCormick G, Holmes KK: Chlamydia trachomatis as a cause of acute "idiopathic" epididymitis. *N Engl J Med* 1978; 298: 301-304

Berger RE, Karp LE, Williamson RA, Koehler J, Moore DE, Holmes KK: The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1982; 37: 557-564

Berger RE, Smith WD, Critchlow CW, Stenchever MA, Moore DE, Spadoni LR et al.: Improvement in the sperm penetration (hamster ova) assay (SPA) results after doxycycline treatment of infertile men. *J Androl* 1983; 4: 126-130

Bowie WR: Urethritis in males. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner PJ, editors. *Sexually transmitted diseases*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1984: 638-650

Boyers SP, Davis RO, Katz DF: Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1989; 12: 165-200

Bruce AW, Chadwick P, Willett WS, O'Shaughnessy M: The role of chlamydiae in genitourinary disease. *J Urol* 1981; 126: 625-629

Bruce AW, Reid G: Prostatitis associated with Chlamydia trachomatis in 6 patients. *J Urol* 1989;142: 1006-1007

Brunner H, Weidner W, Schiefer HG: Studies on the role of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in prostatitis. J Infect Dis 1983; 147: 807-813

Close CE, Roberts PL, Berger RE: Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. J Urol 1990; 144: 900-903

Cohen J, Edwards R, Fehilly C, Fishel S, Hewitt J, Purdy J, et al.: In vitro fertilization: a treatment for male infertility. Fertil Steril 1985; 43: 422-432

Comhaire F, Rowe PJ, Farley TMM: The effect of doxycycline in infertile couples with male accessory gland infection: a double blind prospective study. Int J Androl 1986; 9: 91-98

Cumming JA, Dawes J, Hargraeve TB: Granulocyte elastase levels do not correlate with anaerobic and aerobic bacterial growth in seminal plasma from infertile men. Int J Androl 1990; 13: 273-277

Davis RO, Boyers SP: The role of digital image analysis in reproductive biology and medicine. Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 351-363

De Geyter C, De Geyter M, Behre HM, Schneider HPG, Nieschlag E: Peroxidase-positive round cells and microorganisms in human semen together with antibiotic treatment adversely influence the outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer. Int J Androl 1994; 17: 127-134

Depuydt C, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Comhaire F: Mechanisms of sperm deficiency in male accessory gland infection. Androl 1998; 30: 29-33

Doempfmer R.: Das Ejakulat. In: Schuermann H., Doempfmer R.: Fertilitätsstörungen beim Manne. Springer, Berlin 1960

Dunphy BC, Kay R, Baratt LR, Cooke ID: Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl* 1989; 10: 376-382

Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1970;3:308-326

Dym M, Romrell LJ. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J Reprod Fertil* 1975; 42: 1-7

Eggert-Kruse W, Bellmann A, Rohr G, Tilgen W, Runnebaum B: Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. *Fertil Steril* 1992;58: 1046-1055

Eggert-Kruse W, Reimann-Anderson J, Rohr G, Pohl S, Tilgen W, Runnebaum B: Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria a relationship with sperm-mucus interaction in vivo and in vitro. *Fertil Steril* 1995; 63: 612-624

El-Demiry MI, Hargraeve TB, Busuttil A, Elton R, James K, Chisholm GD: Immunocompetent cells in human testis in health and disease: *Fertil Steril* 1987; 48: 470-479

El-Demiry MIM, Hargraeve TB, Busuttil A, James K, Ritchie AWS, Chisholm GD: Lymphocyte sub-populations in the male genital tract. *Br J Urol* 1985; 57: 769-774

El-Demiry MIM, Young H, Elton RA, Hargraeve TB, James K, Chisholm GD: Leukocytes in the ejaculate from fertile and infertile men. *Br J Urol* 1986;58: 715-720

Enginsu ME, Dumoulin JC, Pieters MH, Evers JL, Geraedts JP: Predictive value of morphologically normal sperm concentration in the medium for in-vitro fertilization. *Int J Androl* 1993; 16: 113-120

Ernst H: Einführung in die digitale Bildverarbeitung. Franzis-Verlag, München 1991

Franco B, Renato Z, Giulio B: Mycoplasmic localization patterns on spermatozoa from infertile men. *Fertil Steril* 1984; 42: 412-417

Gerhard I, Lenhard K, Eggert-Kruse W, Runnebaum B: Clinical data with influence semen parameters in infertile men. *Hum Repro* 1992; 7: 830-837

Giamarellou H, Tympanidis K, Bitos NA, Leonidas E, Daikos GK: Infertility and chronic prostatitis. *Andrologia* 1984; 16: 417-422

Glezerman M: Semen Analysis. In: Bandhauer K, Frick J: Disturbances in male fertility. Springer-Verlag Berlin 1982: 207

Gonzales GF, Kortebani G, Mazzoli AB: Leukocytospermia and function of the seminal vesicles and seminal quality. *Fertil Steril* 1992; 57: 1058-1065

Greenblatt RM, Handsfield HH, Sayers MH, Holmes KK: Screening therapeutic insemination donors for sexually transmitted diseases: overview and recommendations. *Fertil Steril* 1986; 46: 351-364

Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ, Toner JP, Swanson RJ, Kruger TF, Muasher SJ: Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in-vitro fertilization population. *Fertil Steril* 1994; 62: 559-567

Haidl G, Schill WB: Spermatozoenmorphologie und Fertilitätsprognose. Hautarzt 1992; 43: 607-609

Hargreave TB, Nilsson S: Seminology. In: Male infertility. Springer, Berlin 1983: 56

Harrison PE, Barrat CLR, Robinson AJ, Kessopoulou E, Cooke ID: Detection of white blood cell populations in the ejaculate of fertile men. J Reprod Immunol 1991;19: 95-98

Hellings G: Clinical Andrology. William Heinemann Ltd., London 1976

Hermo L, Lalli M: Monocytes and mast cells in the limiting membrane of human seminiferous tubules. Biol Reprod 1978; 19: 92-100

Hillier SL, Rabe LK, Muller CH, Zarutskie P, Kuzan FB, Stenchever MA: Relationship of bacteriologic characteristics to semen indices in men attending an infertility clinic. Obstet Gynecol 1990;75: 800-804

Hinting A, Comhaire F, Schonjaans F: Capacity of objectively assessed sperm motility characteristics in differentiating between semen of fertile and subfertile men. Fertil Steril 1988; 50: 635-639

Hofmann N, Haider SG: Neue Erkenntnisse morphologischer Diagnostik der Spermatogenesestörungen. Gynäkologe 1985; 18: 70-80

Hofmann N, Klasa M, Behrendt H, Hilscher B, Haider SG, Passia D, Hilscher W: Appearance of mast cells in human testis with sertoli cell only syndrome. Fortschr Androl 1983; 8: 122-129

Hofmann N: Die Beurteilung von Störungen der Spermatogenese und der männlichen Fertilität aufgrund spermatologischer Untersuchungsergebnisse. Z Hautkr 1979; 54: 5-13

Hofstetter A, Schmied E: Mykoplasmenvorkommen bei entzündlichen Erkrankungen des Urogenitaltraktes. Urologe 1970; 9: 200-204

Holland-Moritz H, Krause W: Semen analysis and fertility prognosis on andrological patients. Int J Andrology 1992; 15: 473-484

Holstein AF: Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen. Stuttgart: Thieme-Verlag, 1978

Homyk M, Anderson DJ, Wolff H, Herr JC: Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. Fertil Steril 1990;53: 323-329

Hotchkiss RS: Fertility in Men. Lippincott, Philadelphia (1941)

Joel C.A.: Studien am menschlichen Sperma. Schwabe, Basel 1953

Johnson MH. An immunological barrier in the guinea pig testis. J Pathol 1970; 101: 129-139

Katz DF, Morales P, Samuels SJ, Overstreet JW: Mechanisms of filtration of morphologically abnormal sperm by cervical mucus. Fertil Steril 1990; 54: 513-516

Krause W, Rothauge CF: Andrologie, Enke, Stuttgart 1981

Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo S, Acosta AA: A quick reliable staining technique for sperm morphology. Arch Androl 1987; 18: 275-78

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 112-117

Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118-1123

Kruger TF, TuToid TC, Franken DR, Acosta AA, Oehninger SC, Menkveld R, Lombard CJ: A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil Steril* 1993; 59: 202-209

Kruse H, Mangold R, Mechler B, Penger O: Programmierung Neuronaler Netze. Addison-Wesley 1991

Kung AWC, Ho PC, Wang C: Seminal leukocyte subpopulations and sperm function in fertile and infertile Chinese men. *Int J Androl* 1993; 16: 189-194

Lang DJ, Kummer JF: Demonstration of cytomegalovirus in semen. *N Engl J Med* 1972; 287: 756-758

Leib Z, Bartoov B, Eltes F, Servadio C: Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: an enigma or reality? *Fertil Steril* 1994; 61: 1109-1116

Ludwig G, Frick J: Praxis der Spermatologie. 2. Auflage; Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer 1996

MacLeod J.: Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. *Int J Fertil* 1964; 9: 281-290

Maruyama DK, Hale RW, Rogers NJ: Effects of white blood cells on the in vitro penetration of zona-free hamster eggs by human spermatozoa. *J Androl* 1985; 6: 127-135

Maseki Y, Miyake K, Mitsuya H, Kitamura H, Yamada K: Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 1981;36: 814-817

Matorras R, Corcostegui B, Perez C, Mandiola M, Mendoza R, Rodriguez-Escudero FJ: Sperm morphology analysis (strict criteria) in male infertility is not a prognostic factor in intrauterine insemination with husband's sperm. *Fertil Steril* 1995; 63: 608-611

Mayaux MJ, Schwartz D, Czyglik F, David G: Conception rate according to semen characteristics in a series of 15364 insemination cycles: Results of a multivariate analysis. *Andrologia* 1985; 17: 9-15

Meares EM: Prostatitis syndromes: new perspectives about old woes. *J Urol* 1980; 123: 141-147

Menkveld R, Kruger TF: Sperm morphology and male urogenital infections. *Androl* 1998; 30: 49-53

Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger TF, Van Zyl JA: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990; 5: 586-92

Merlin TL, Gibson DW, Connor DH: Infectious and parasitic diseases. In: Rubin E, Farber JL, editors. *Pathology*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994: 336-352

Micic S, Macura M, Lalic N, Dotlic R: Elastase as an indicator of silent genital tract infection in infertile men. *Int J Androl* 1989; 12: 417-422

Moench GL: Relation of certain seminal findings to fertility. *Am J Surg* 1940; 47: 586-591

Mortimer D: Objective analysis of sperm motility and kinematics. In: Keel BA, Webster BW: *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. CRC Press, Boca Raton 1990: 97-133

Nagai T, Tabaka H, Miyake K, Hirabayashi Y, Yamada K: Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 1992; 57: 1331-1336

Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E: External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990; 54: 308-313

Olsen GP, Shields JW: Seminal lymphocytes, plasma and AIDS. *Nature* 1984; 309: 116-117

Paavonen J, Wolner-Hansen P: Chlamydia trachomatis: a major threat to reproduction. *Hum Reprod* 1989; 4: 111-124

Papanicolaou GN: A new procedure for staining vaginal smear. *Science* 1942; 95: 438-450

patients. *J Urol* 1989; 142: 1006-1007

Phadke AM, Phadke GM: Occurance of macrophag cells in the semen and in the epididymis in cases of male infertility. *J Reprod Fertil* 1961; 2: 400- 403

Phadke AM: Spermiophage cells in man. *Fertil Steril* 1975; 26: 760-774

Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM: Stability of basic semen measures and abnormal morphology within individuals. *J Androl* 1986; 7: 211-214

Politch JA, Wolff H, Hill JA, Anderson DJ: Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1993; 60: 372-375

Pöllänen P, Niemi M: Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int J Androl* 1987; 10: 37-42

Purvis K, Christiansen E: Infection in the male reproductive tract. Impact diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl* 1993; 16: 1-13

Ritchie AWS, Hargraeve TB, James K, Chisholm GD: Intraepithelial lymphocytes in the normal epididymis: a mechanism for tolerance to sperm-autoantigens? *Br J Urol* 1984; 56: 79-84

Schwartz D, Mayaux MJ, Spira A, Moscato ML, Jouannet P, Czyglik F, David G: Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. *Fertil Steril* 1983; 39: 530-535

Sellers JW, Mahony JB, Chernesky MA, Rath DJ: Tubal factor infertility: an association with prior chlamydial infection and asymptomatic salpingitis. *Fertil Steril* 1988;49: 451-457

Singer R., Sagiv M., Barnet M., Segenreich E., Allalouf D., Landau B., Servadio C.: Motility, vitality and percentage of morphologically abnormal forms of human spermatozoa in relation to sperm counts. *Andrologia* 1980; 12: 92-98

Soffer Y, Ron-El R, Golan A, Herman A, Caspi E, Samra Z: Male genital mycoplasmas and *Chlamydia trachomatis* culture: its relationship with

accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity. *Fertil Steril* 1990; 53: 331-336

Steigerwald P, Krause W: Estimation of sperm morphology using a new CASA system. *Andrologia* 1998; 30: 23-27

Steinfeldt T, Krause W: Influence of leukocytospermia on the morphology of human spermatozoa. *Proceedings of the Annual Meeting of the DGA*, 2001. *Andrologia* 2002; 34:134

Talbert LM, Hammond MG, Halme J, O`Rand M, Fryer JG, Ekstrom RD. Semen parameters and fertilization of human oocytes in-vitro: a multivariable analysis. *Fertil Steril* 1987; 48: 270-277

Tomlinson MJ, Barratt CLR, Cooke ID: Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 1993; 60: 1069-1075

Tomlinson MJ, White A, Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID: The removal of morphological abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum Reprod* 1992; 7: 517- 522

Toth A, Lesser ML: *Ureaplasma urealyticum* and infertility: The effect of different antibiotic regimes on the semen quality. *J Urol* 1982; 128: 705-707

Tung KSK, Unanue ER, Dixon FJ: Pathogenesis of experimental allergic orchitis. *J Immunol* 1971; 106:1453-1472

Tung KSK, Yule TD, Mahi-Brown CA, Listrom MB. Distribution of histopathology and Ia positive cells in actively induced and passively transferred experimental autoimmune orchitis. *J Immunol* 1987; 138: 752-759

Wahl FM: Digitale Bildverarbeitung. Nachrichtentechnik Bd. 13. Springer Verlag, Berlin 1984

Wang AW, Politch J, Anderson DJ: Leukocytospermia in male infertility patients in China. *Andrologia* 1994; 26: 167-172

Wang YF, Holstein AF: Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell Tissue Res* 1983; 233: 517-522

WHO: Handbuch zur Laboruntersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermatozoen-Zervikalschleim-Interaktion. Springer, Berlin (1999)

Williams WW: Germ plasm factor in sterility. *New Eng J Med* 1937; 217: 946-951

Wolff H, Anderson DJ: Immunhistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril* 1988; 49: 497-1006

Wolff H, Neubert U, Volkenandt M, Zöchling N, Schlüpen EM, Bezold G et al.: Detection of chlamydia trachomatis in semen by antibody-enzymeimmunoessay compared to polymerase chain reaction, antigen-enzymeimmunoassay and urethral cell culture. *Fertil Steril* 1994; 62: 1250-1254

Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ: Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 1990; 53: 528-536

Wolff H: The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1995; 63: 1143-1157

Wølnner-Hanssen P, Mårdh P: In vitro tests of the adherence of Chlamydia trachomatis to human spermatozoa. *Fertil Steril* 1984; 42: 102-107

Wuttke W: Die Sexualfunktionen. In Schmidt R, Tews G (Hrsg.), Physiologie des Menschen (20. Auflage). Berlin, Springer 1990: 820-836

Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF: The correlation of ureaplasma infection with infertility. Androl 1997; 29: 219-226

Yeung CH, Nashan D, Sorg C, Oberpfennig F, Schulze H, Nieschlag E, Cooper TG: Basal cells of the human epididymis – antigenic and ultrastructural similarities to tissue fixed macrophages. Biol Reprod 1994; 917-926

Zaini A, Jennings MG, Baker HWG: Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men ? Int J Androl 1985; 8: 427-43

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beato, Bertalanffy, Bien, Brandt, Cetin, Czubayko, Effendy, Fruhsdorfer, Geks, Gerst, Geus, Görg, Gotzen, Grau, Griss, Grzeschik, Happle, Heeg, Heufelder, Horn, Joseph, Jungclas, Kaiser, Katschinski, Kern, Kienapfel, Klose, Koolmann, Kraft, Krause, Kroh, Kroll, Kuni, Lange, Lennartz,, Leppek, Löffler, Maisch, McGregor, Meinhardt, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Peter, Pfab, Printz, Ramaswamy, Rausch, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schmidt, Schultz, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sturm, Voigt, Weihe, Welcke, von Wichert, Wirth, Wulf

7.2 Lebenslauf

Am 28. Februar 1973 wurde ich als zweites Kind von Christa Herta Steinfeldt, geborene Kemper, und Johannes Steinfeldt in Eutin geboren.

Meine Schulzeit begann ich im Jahre 1979 mit dem Besuch der Grundschule in Ascheberg/ Holstein. Von 1983 bis 1993 besuchte ich das Internatsgymnasium Schloss Plön, an dem ich 1993 mein Abitur ablegte.

Das Studium der Humanmedizin begann ich im Sommersemester 1996 an der Philipps-Universität Marburg. Nach dem Bestehen der ärztlichen Vorprüfung im Frühjahr 1998 folgten im Frühjahr 1999 der erste, im Frühjahr 2001 der zweite und im Juni 2002 der dritte Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Im September 1999 begann ich mit dem experimentellen Teil meiner Dissertation in der Abteilung für Andrologie der Philipps-Universität Marburg. Der Zeitraum in dem die Untersuchungen vorbereitet, durchgeführt und ausgewertet wurden, erstreckte sich bis zum April 2001. In der darauffolgenden Zeit bis zum November 2001 habe ich die Dissertation verfasst. Im September 2001 veröffentlichte ich die Ergebnisse im Rahmen eines Postervortrags auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Andrologie in Berlin sowie als Abstract in *Andrologia* (Steinfeldt et al., 2002).

Marburg, im Juli 2002

7.3 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Krause möchte ich mich hiermit ganz herzlich für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Leinweber, die mich bei allen praktischen Belangen im Labor unterstützte und mir immer mit „Tipps und Tricks“ zur Seite stand.

Auch bei Frau Benseler möchte ich mich in diesem Rahmen herzlichst bedanken, ohne die ich sicherlich nicht so schnell und zuverlässig die zu untersuchenden Patienten hätte zusammenstellen können.

Meiner lieben Frau Dr. Beleke Steinfeldt möchte ich für die weitergegebenen Erfahrungen, Ratschläge sowie der permanenten Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit meinen Dank aussprechen.

Meinem Freund Frank-Simon Basel möchte ich an dieser Stelle für die Bekräftigung und Unterstützung bei der Wahl des Studienganges Humanmedizin danken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Der Einfluss einer Leukozytospemie auf die Morphologie humaner Spermatozoen“ in der Klinik für Andrologie und Venerologie unter der Leitung von Prof. Dr. Krause ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Postervortrags auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Andrologie im September 2001 in Berlin und als Abstract in *Andrologia* (s.u.) veröffentlicht.

Steinfeldt T, Krause W: Influence of leukocytospermia on the morphology of human spermatozoa. Proceedings of the Annual Meeting of the DGA, 2001. *Andrologia* 2002; 34:134

Marburg, den 12.07.2002